

Die Generierung von bioartifiziellen
Knochenersatzgeweben
im AV-Loop-Modell der Ratte

von Sophie Winkler

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Generierung von bioartifiziellen
Knochenersatzgeweben
im AV-Loop-Modell der Ratte

von Sophie Winkler
aus Berlin

München 2021

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Lehrstuhl für Chirurgie der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Angefertigt in der Plastisch- und
Handchirurgischen Klinik
Universitätsklinikum Erlangen
Mentor: Prof. Dr. Andreas Arkudas

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K.
Straubinger, Ph.D.

Berichterstatterin: Univ.-Prof. Dr. Andrea
Meyer-Lindenberg

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards
Priv.-Doz. Dr. Karin Weber
Univ.-Prof. Dr. Johann Maierl
Univ.-Prof. Dr. Gabriela
Knubben-Schweizer

Tag der Promotion: 06. Februar 2021

Für meine Schwester und meine Eltern

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden vorab wie folgt veröffentlicht:

Steiner, D., Winkler, S., Biggemann, J., Fey, T., Greil, P., Körner, C., Weisbach, V., Meyer-Lindenberg, A., Mutschall, H., Arkudas, A., Horch, R. E. (2019): HUVECs Support Bone Formation Of ADSC-loaded Osteogenic Matrices In The Rat AV Loop Model. The 11th European Plastic Surgery Research Council (EPSRC) Meeting, 23.–25.08.2019, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Straße 22 D - 81675 München, Germany

Winkler, S., Biggemann, J., Fey, T., Greil, P., Körner, C., Weisbach, V., Meyer-Lindenberg, A., Mutschall, H., Horch, R.E., Arkudas, A., Steiner, D. (2019): Intrinsic vascularization of ADSC-loaded hydrogel scaffolds in the rat AV loop model. Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) - Symposium „Translational Medicine“, 27.–28.06.2019, Kloster Banz, Kloster Banz 18, 96231 Bad Staffelstein, Germany

Steiner, D., Winkler, S., Biggemann, J., Fey, T., Greil, P., Körner, C., Weisbach, V., Meyer-Lindenberg, A., Mutschall, H., Arkudas, A., Horch, R. E. (2019): Abstract 133: HUVECs Support Bone Formation Of ADSC-loaded Osteogenic Matrices In The Rat AV Loop Model. The 11th European Plastic Surgery Research Council (EPSRC) Meeting, 23.–25.08.2019, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Ismaninger Straße 22 D - 81675 München, Germany. In: Plastic and Reconstructive Surgery, Global Open:2020, April, 8(4S), 8

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Knochengewebe	3
2.1.1 Histologische Knochenstruktur	3
2.1.2 Ossifikation	7
2.1.2.1 Desmale Ossifikation	7
2.1.2.2 Chondrale Ossifikation	8
2.1.3 Knochenzellen und ihre Funktionen	11
2.1.4 Knochenerkrankungen	13
2.1.4.1 Knochenfrakturen	16
2.1.4.2 Knochenfrakturheilung	17
2.1.4.3 Chirurgisches Management von Knochenfrakturen	18
2.2 Knochen Tissue Engineering	20
2.2.1 Biofabrikationstechniken	21

2.2.1.1 Verkapselung	21
2.2.1.2 Bioprinting	22
2.2.2 Biomaterialien	24
2.2.2.1 Hydrogele	25
2.2.2.2 Spinnenseiden	30
2.2.2.3 Metall-basierte Hartmatrices	33
2.2.2.4 Synthetische Polymere und Wachstumsfaktoren	34
2.2.2.5 Biokeramiken	35
2.2.3 Implantation von Biomaterialien	39
2.2.4 Zellimplantation	46
2.2.4.1 Mesenchymale Stammzellen	46
2.2.4.2 Endothelzellen	49
2.3 Angiogenese	52
2.3.1 Chirurgisch induzierte Angiogenese	55
2.3.1.1 Das AV-Loop-Modell	57
2.4 Analyse der Konstruktvascularisation und Knochenneubildung	63
2.4.1 3D-Quantifizierung der Vaskularisation	63

2.4.2	Histologische Quantifizierung	68
3	Publikationen	75
3.1	Publikation 1	75
3.2	Publikation 2	87
4	Diskussion	99
5	Zusammenfassung	127
6	Summary	131
7	Literaturverzeichnis	135
8	Danksagung	159

Abkürzungsverzeichnis

μCT	μ-Computertomographie
3D	Dreidimensional
A.	Arteria
ADA-GEL	Alginat-Dialdehyd-Gelatine
ADSC	Adipose-Derived Stem Cell
AP	Alkalische Phosphatase
AV	Arteriovenous
BCP	Biphasisches Calciumphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPC	Endothelial Progenitor Cells
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorter
FOXN1	Forkhead-box n1
GelMa	Gelatin methacrylate
GIMP	Gnu Image Manipulation Program
HE	Hämatoxylin-Eosin
HA	Hydroxylapatit
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
K.I.U.	Kallikrein Inhibitor Unit
I.U.	International Units

MATLAB	Matrix Laboratory
MSC	Mesenchymal Stem Cell
PCL	Poly- ϵ -Caprolacton
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFA	Paraformaldehyd
PGS	Polyglycerin-Sebacat
PLDLLA	Poly-L-DL-Lactic Acid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RNU	Rowett Nude
RUNX2	Runt-related Transcription Factor 2
s.c.	subcutan
STL	Standard Triangulation Language
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
USP	United States Pharmacopeia
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
β -TCP	β -Tricalciumphosphat

1 Einleitung

Die Rekonstruktion größerer Knochendefekte stellt im klinischen Alltag eine chirurgische Herausforderung dar. Aufgrund von Instabilität, Nekrosen der Frakturenenden, unüberbrückbaren Kontinuitätsunterbrechungen oder Infektionen, kann eine Implantation von autogenem, allogenen Knochen oder Knochenersatzmaterialien notwendig werden (Vogel, 2015; Schemitsch, 2017). Transplantationen von spongiösem, allogenen Knochen bergen jedoch die Risiken einer Transplantatabstoßung, Entnahmemorbidität oder einer ungenügenden Transplantatintegration (Banwart *et al.* 1995; Keating *et al.* 2005).

Auf dem Gebiet des Knochen Tissue Engineerings wird daher an alternativen Knochenersatzmaterialien geforscht. Die Ansprüche an die Materialien sind ein Zusammenspiel aus einer Biokompatibilität, einer Eignung als Zellträgermaterial und einer Förderung der Geweberegeneration (Lee *et al.* 2014; Yu *et al.* 2015; Guan *et al.* 2017). Hydroxylapatit (HA) kommt physiologisch als anorganische Substanz in Form von HA-Kristallen im Knochen vor (McGavin & Zachary, 2009) und wurde als Knochenersatzmaterial bereits erfolgreich implantiert (Holmes *et al.* 1987). Spinnenseidenproteine überzeugen durch ihre mechanische Stabilität und biologische Abbaubarkeit (Zeplin *et al.* 2014). Hydrogele, wie Fibrin, sind in ihrer

Beschaffenheit und ihrem Wassergehalt der Extrazellulärmatrrix ähnlich, was sie zu geeigneten Zellträgermaterialien macht (Guan *et al.* 2017). Doch nicht nur das Biomaterial, sondern auch die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung über das Blutgefäßsystem sind für den Erhalt der Zellvitalität von Bedeutung. Per Diffusion ist eine Versorgung nur über eine Distanz von 150 – 200 μm sichergestellt (Folkman & Hochberg, 1973), weshalb eine unzureichende Vaskularisation einen limitierenden Faktor größerer Materialkonstrukte darstellt (Arkudas *et al.* 2007a). Eine mögliche Lösung stellt hierbei die chirurgisch induzierte Angiogenese mittels des Arteriovenous (AV)-Loop-Modells dar. Erol und Spira (1979) fanden heraus, dass ausgehend von einer Gefäßschleife, Gefäße in das umliegende Gewebe aussprossen und im Rattenmodell zu einer Vaskularisierung eines transplantierten Hautlappens führten. Durch die chirurgische Anastomose der *Vena (V.)* und *Arteria (A.) femoralis* mit einem kontralateralen Veneninterponat zu einer Gefäßschleife, existiert ein vielversprechendes Modell zur Vaskularisation implantierter Biomaterialien sowie zur Neubildung von Knochengewebe (Buehrer *et al.* 2015; Weigand *et al.* 2015; Polykandriotis *et al.* 2008; Arkudas *et al.* 2010). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Generierung von bioartifiziellen Knochenersatzgeweben im AV-Loop-Modell bei der Ratte zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Knochengewebe

2.1.1 Histologische Knochenstruktur

Knochengewebe hat im Skelett eine Stützfunktion, eine metabolische Aufgabe zur Bildung von Blutzellen im roten Knochenmark und dient als wichtiger Calcium (Ca) -Speicher. Die anorganische Knochenmatrix besteht zu 65 % aus Ca, Phosphor, Magnesium, Karbonat, Zink, Kupfer, Natrium, Mangan und Fluorid, welche als HA-Kristalle im vollmineralisierten Knochen vorliegen (McGavin & Zachary, 2009).

Die 35 % organische Grundsubstanz des Knochengewebes besteht zu 90 % aus Kollagenfasern Typ 1 sowie einer ungeformten Komponente aus Proteoglykanen, Lipiden, adhäsiven Glykoproteinen wie Osteokalzin, Osteonektin sowie Osteopontin und Wasser. Durch den Austausch von Wasser mit Mineralsalzen wird eine Mineralisierung des Knochenosteoids erreicht (Aumüller *et al.* 2007; McGavin & Zachary, 2009).

Es gibt zwei Arten von Knochengewebe. Zum einen den Geflechtknochen und zum anderen den Lamellenknochen. Geflechtknochen bleibt nur in einigen knöchernen Sehnenansätzen, im knöchernen Ohrlabyrinth und im äußeren Gehörgang lebenslang erhalten. Er besteht aus Kollagenfasern,

welche keine spezifische Laufrichtung aufweisen und einer Vielzahl an Knochenzellen. Nach der embryonalen Anlage wird er in den übrigen langen Röhrenknochen, platten und kurzen Knochen, durch den stabileren Lamellenknochen ersetzt. Der Lamellenknochen besteht aus mehreren Osteonen mit einem zentral perforierenden Havers-Kanal, welcher mit Blutgefäßen (Havers-Gefäßen), lockerem Bindegewebe und Nervenfasern gefüllt ist. Um die Osteone reihen sich zirkulär die Speziallamellen, welche aus parallel angeordneten Kollagenfasern Typ 1 und der mineralisierten Knochenmatrix bestehen. Innerhalb und zwischen den Lamellen sind eine Vielzahl an Osteozyten in Lakunen regelmäßig angeordnet (Knochenhöhlen, *Lacunae osseae*), welche durch Zytoplasmaausläufer in den Knochenkanälchen (*Canaliculi ossei*) miteinander verbunden sind (Aumüller *et al.* 2007; König & Liebich, 2014). Jedes Osteon ist durch eine Zementlinie von den übrigen Osteonen abgegrenzt.

Durch Umbauprozesse in der Knochenstruktur entstehen zwischen den Osteonen die Schaltlamellen, welche keine eigene Vaskularisation besitzen und Reste von zum Teil abgebauten Osteonen darstellen. Um den Knochen herum befindet sich das Periost, welches über die quer verlaufenden Volkmann-Gefäße in den Volkmann-Kanälen mit den Gefäßen in den Havers-Kanälen verbunden ist. Dem Geflechtknochen

fehlt diese gerichtete Anordnung von Blutgefäßen (McGavin & Zachary, 2009). Die Osteone in der Knochenschicht unterhalb des zweischichtigen Periosts, dem kompakten Knochen oder *Substantia compacta*, sind besonders dicht gepackt, um eine mechanische Stabilität zu gewährleisten. Begrenzt wird die *Substantia compacta* von den äußeren und inneren Grundlamellen. Die weiter innen liegende Schicht wird als spongioser, trabekulärer Knochen oder *Substantia spongiosa* bezeichnet. Anstelle der Spongiosa liegt in der Diaphyse die zentrale Markhöhle. Das Knochenmark wird von der Spongiosa und der Markhöhle eingeschlossen. Die Grenzschicht zum Knochenmark bildet hierbei das Endost (König & Liebich, 2014).

Der trabekuläre Knochen beinhaltet Lamellen, welche nicht in Osteonen, sondern parallel angeordnet sind. Durch eine lebenslange Remodellierung der Knochenstrukturen wird eine ständige Reparatur von Mikrofrakturen und eine Anpassung an eine mechanische Beanspruchung ermöglicht (McGavin & Zachary, 2009).

Die nachfolgende Abbildung 1 stellt den Aufbau eines Röhrenknochens dar (aus: König & Liebich, 2014).

Abbildung 2 zeigt die detaillierte Darstellung des Havers-Systems und der *Substantia compacta* eines Röhrenknochens (aus: König & Liebich, 2014).

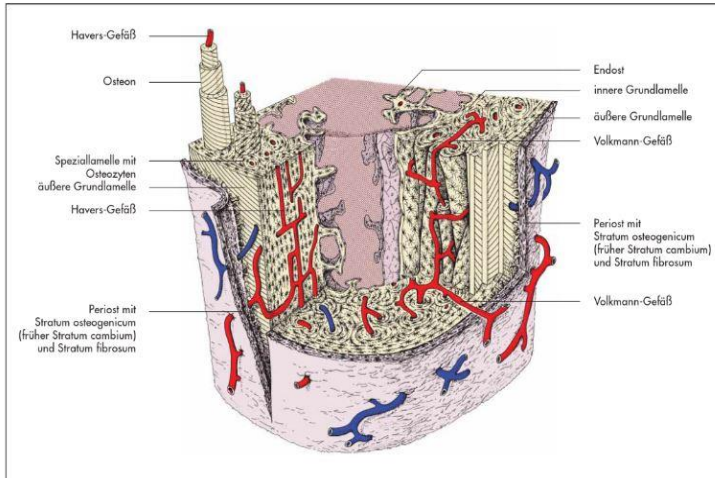


Abb. E-22. Schematische Darstellung eines Abschnitts aus der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens.

Abbildung 1: Aufbau eines Röhrenknochens.

(Aus: König & Liebich, 2014)

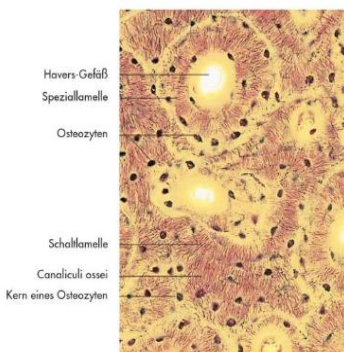


Abb. E-23. Histologischer Schnitt durch die Substantia compacta eines Röhrenknochens (Querschnitt, Schmorl-Färbung).

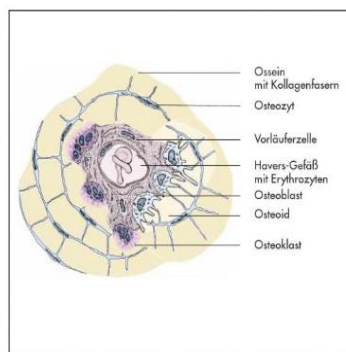


Abb. E-24. Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein Havers-System im Stadium des Umbaus.

Abbildung 2: Aufbau der Substantia compacta und des Havers-Systems eines Röhrenknochens.

(Aus: König & Liebich, 2014)

2.1.2 Ossifikation

Bei der Knochenbildung können zwei verschiedene Arten unterschieden werden. Die direkte, desmale Ossifikation, die auch als primäre Ossifikation bezeichnet wird und die sekundäre Ossifikation oder chondrale Ossifikation (König & Liebich, 2014).

2.1.2.1 Desmale Ossifikation

Die desmale Ossifikation stellt eine direkte Knochenbildung aus mesenchymalem Bindegewebe ohne eine Knorpelbildung dar. Entwicklungsgeschichtlich bildet sie den primären Geflechtknochen, welcher jedoch im Laufe der Zeit, mit wenigen Ausnahmen, durch Lamellenknochen ersetzt wird. Bei der indirekten Heilung von Knochenfrakturen sowie bei den Schädeldeckknochen und der Mandibula kommt der Geflechtknochen zeitlebens vor (Aumüller *et al.* 2007).

Mesenchymale Stammzellen verdichten sich und differenzieren sich zu Osteoprogenitorzellen und anschließend zu Osteoblasten. Diese produzieren die Knochenmatrix, das Osteoid. Durch die Osteoidproduktion werden die Osteoblasten eingemauert und stehen ausschließlich für die Nährstoffversorgung über ihre Zytoplasmafortsätze in den *Canaliculi ossei* in Verbindung (Aumüller *et al.* 2007). In das umliegende, lockere Bindegewebe sprießen Blutgefäße ein.

Die Kollagenfasern Typ 1 stehen für die nachfolgende Mineralisierung als Kristallisationskerne zur Verfügung. Durch eine Anlagerung von anorganischen Knochensubstanzen (Ca-Phosphat-Verbindungen) über das Blutgefäßsystem, kommt es innerhalb von 8-10 Tagen zu einer Mineralisierung des Osteoids zu Ossein (König & Liebich, 2014).

Die Osteoblasten differenzieren sich zu Osteozyten und an den äußeren, entstandenen Knochenbälkchen aus Ossein lagern sich Osteoklasten in Howship-Lakunen an (König & Liebich, 2014).

2.1.2.2 Chondrale Ossifikation

Die meisten Knochen entstehen durch diese Form der Knochenbildung. Auch das Längenwachstum der langen Röhrenknochen erfolgt durch eine Umwandlung der Knorpelmatrix in Knochengewebe. Sie wird unterteilt in eine 1. Phase, der perichondralen Ossifikation und eine 2. Phase, der enchondralen Ossifikation. An der Diaphyse der Röhrenknochen verläuft sie zweiphasig und an der Epiphyse einphasig (König & Liebich, 2014).

Bei der perichondralen Ossifikation wird aus dem Perichondrium, welches die knorpelige Diaphyse umgibt, durch die Umwandlung von Chondroblasten in Osteoblasten, eine Knochenmanschette. Die Knochenmanschette ist das Periost, welches ausgehend vom Zentrum der Diaphyse weiter nach

distal und proximal gebildet wird. Die Kompression durch die entstehende Knochenmanschette verursacht im Knorpelgerüst eine Hypertrophie und säulenartige Anordnung der Chondrozyten. Blutgefäße sprossen ein und ermöglichen den Knorpelabbau durch Chondroklasten. Die Mineralisierung der Extrazellulärmatrix wird initiiert.

Der primäre Ossifikationskern wird nun in die zweite Phase übergeleitet. Die enchondrale Ossifikation erfolgt zuerst in der Diaphyse und anschließend in der Epiphyse. Der abgebaute Knorpel wird nun durch Knochengewebe ersetzt, sodass eine Knorpel-Knochen-Grenze mit unterschiedlichen Zonen entsteht (König & Liebich, 2014).

Diese Zonen bleiben besonders in den Wachstumszonen der Röhrenknochen erhalten, da dort die Ossifikation bis zum Abschluss des Längenwachstums erfolgt (Aumüller *et al.* 2007; König & Liebich, 2014). Chondroklasten entwickeln sich aus Monozyten und gelangen über die einsprossenden Blutgefäße aus der primären Markhöhle in die Eröffnungszone, in welcher sie die apoptotischen Chondroblasten abbauen. Die mineralisierte Knorpelmatrix wird enzymatisch abgebaut und es kommt zum Neu- und Umbau von Knochenbälkchen in der Ossifikationszone durch die Aktivität der Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten. An die Eröffnungs- und Ossifikationszone grenzt die Blasenknorpelzone. Durch die

Kompression der Knochenmanschette hypertrophieren die Chondrozyten und ordnen sich säulenartig bis zum Beginn der Reserveknorpelzone an. In dieser Zone ruhen diffus angeordnete Chondrozyten, welche für das Längenwachstum bereitgestellt werden. Die Extrazellulärmatrix ist nicht mineralisiert (Aumüller *et al.* 2007; König & Liebich, 2014; McGavin & Zachary, 2009). Der Einsatz von chondrogen prädifferenzierten, murinen embryonalen Stammzellen und eine damit verbundene chondrale Ossifikation wurde auf dem Gebiet des Tissue Engineerings für eine zukünftige Regeneration von Knorpelgewebe bereits beschrieben (Jukes *et al.* 2008). Abbildung 3 stellt die verschiedenen Zonen während der chondralen Ossifikation dar (aus: König & Liebich, 2014).

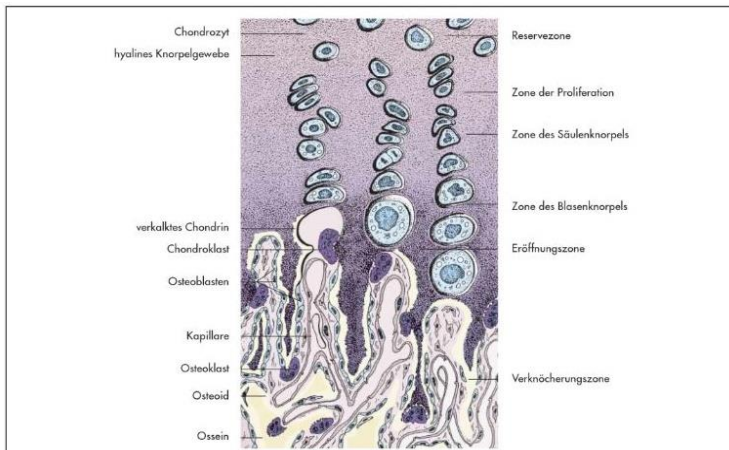


Abb. E-21. Schematische Darstellung der strukturellen Umbauvorgänge während der chondralen Ossifikation eines Röhrenknochens.

Abbildung 3: Chondrale Ossifikation eines Röhrenknochens. (Aus: König & Liebich, 2014)

2.1.3 Knochenzellen und ihre Funktionen

Die Knochenzellen im Knochengewebe sind Osteozyten, Osteoblasten und Osteoklasten. Die Osteoblasten sind mesenchymale Zellen, welche an der Knochenoberfläche angeordnet sind. Sie sind hauptsächlich für die Produktion der Knochenmatrix (Osteoid) zuständig. Für die Mineralisierung werden in den Osteoblasten zytoplasmatische Vesikel gebildet, in deren Membran sich Enzyme wie die Alkalische Phosphatase (AP) und die Adenosintriphosphatase befinden (McGavin & Zachary, 2009). Gegen einen Konzentrationsgradienten werden unter anderem Ca und Phosphat in die Vesikel gepumpt, zu amorphen HA-Strukturen angeordnet und kristallisieren schließlich aus. Anschließend ordnen sich die HA-Kristalle außerhalb der Vesikel um die Kollagenfasern an und führen zu einer Mineralisierung der Knochenmatrix (McGavin & Zachary, 2009).

Osteozyten befinden sich innerhalb der Lakunen (*Lacunae osseae*) des mineralisierten Osteoids und sind durch *gap-junctions* miteinander verbunden. Sie sind auch für den Erhalt der Knochensubstanz zuständig, da sie die Fähigkeit besitzen die Osteoblasten zu einer Knochensynthese zu stimulieren (Aumüller *et al.* 2007).

Osteoklasten sind für die Knochenresorption zuständig. Sie besitzen mehrere Zellkerne und entstammen der Granulozyten-

Monozyten-Reihe hämatopoetischer Stammzellen. Reguliert wird die Osteoklastenaktivität über Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks. Die mineralisierte Matrix wird abgebaut, indem zuerst die Mineralien durch Wasserstoffionen aufgelöst werden und anschließend das Kollagen durch Proteinasen abgebaut wird. Die Osteoklasten hinterlassen hierbei die sogenannten Howship-Lakunen und lösen sich von der Knochenoberfläche, sobald eine Bindung von Kalzitonin erfolgt ist.

Zusätzlich zu diesen drei Zelltypen befinden sich im Periost und Endost Osteoprogenitorzellen, welche als undifferenzierte, mesenchymale Stammzellen eine hohe Proliferationsaktivität aufweisen (Aumüller *et al.* 2007; König & Liebich, 2014). Studien zeigten bisher, dass Endothelzellen die Aktivität von osteogenen Stammzellen stimulieren (Lampert *et al.* 2016; Villars *et al.* 2002). *In vitro* konnten Mutschall *et al.* (2020) zeigen, dass eine Kokultivierung von Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) und Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) die AP, den Runt-related Transcription Factor 2 (RUNX2) und auch die Proliferation fördert. RUNX2 ist ein Marker verstärkter Genexpression von osteogenen Differenzierungsmarkern (Bruderer *et al.* 2014). Das Verhältnis von 1:1 HUVECs und ADSCs brachte in der Kokultur die vielversprechendsten Ergebnisse (Mutschall *et al.* 2020).

2.1.4 Knochenerkrankungen

Knochenerkrankungen, welche mit einer erhöhten Frakturneigung oder der Entstehung größerer Knochendefekte in Verbindung stehen, werden in der nachfolgenden Tabelle gemeinsam mit deren Pathogenese und Vorkommen aufgelistet (Kirchner *et al.* 2014; McGavin & Zachary, 2009).

Tabelle 1: Knochenerkrankungen. (Aus: Kirchner *et al.* 2014; McGavin & Zachary, 2009)

Knochen- erkrankung	Pathogenese	Vorkommen
<i>Kongenitale Osteopathien</i> <i>Osteogenesis imperfecta</i>	<ul style="list-style-type: none"> • ein Defekt der Osteoblasten- und Osteozytenfunktion mit einer verminderten Produktion von Kollagen Typ-1 und Osteonektin ➔ Reduzierung der Knochenmasse, Frakturen 	Hund, Kalb, Lamm, Mensch
<i>Osteopetrose</i>	<ul style="list-style-type: none"> • fehlerhafte Knochenresorption durch Osteoklastenfehlfunktion ➔ diffuse Vermehrung der Knochenmasse und funktionelle Insuffizienz, Frakturen 	Hund, Rind, Maus, Schaf, Pferd, Mensch

<i>Osteodystrophien</i> <i>Osteoporose</i>	<ul style="list-style-type: none"> durch Mangelernährung, Immobilisation, Glukokortikoidapplikation, Ca-Mangel (generalisiert), durch Druckatrophien, Inaktivität und Minderperfusion (fokal) ➡ Reduktion der Knochenmasse, Frakturen 	Alle Tierarten, Mensch
<i>Rachitis und Osteomalazie</i>	<ul style="list-style-type: none"> Phosphor- und Vitamin D-Mangel oder Stoffwechselstörungen, chronische Niereninsuffizienz und Fluorose ➡ fehlerhafte Knochenmineralisierung mit Deformationen, Frakturen, Kyphose, Skoliose 	Rachitis: (Jungtier, Kind), Osteomalazie: (Adulte)
<i>Renale Osteodystrophia fibrosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> chronische Niereninsuffizienz ➡ osteoklastischer Knochenabbau und Ersatz durch fibröses Bindegewebe, Kombination mit Osteomalazie 	häufig: Hund, Mensch
<i>Entzündliche Osteopathien</i> <i>Ostitis; Periostitis (Beteiligung des</i>	<ul style="list-style-type: none"> bakterielle Infektionen, Pilze und Viren (selten) bei chronischem Geschehen 	Mensch, Bakterielle Infektionen: häufig Jungtiere

<i>Periosts); Osteomyelitis (Beteiligung der Knochen- markhöhle)</i>	➡ Osteolyse, Nekro- sen, Knochenabbau, Knochenzubildungen (kompensatorisch)	
<i>Aseptische Osteopathien Hypertrophe Osteodystro- phie</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Ursache, Pathogenese unbekannt ➡ Frakturen und Knochenverdichtungen, Osteolysen in der Spongiosa	Junghunde großwüchsi- ger Rassen
<i>Aseptische Knochennek- rosen</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Knocheninfarkte, Hy- peradrenokortizismus, Fettembolien, in- tramedulläre Neoplasien ➡ Minderperfusion des Knochens, Osteo- lyse	Alle Tierarten, Mensch
<i>Neoplasien Primäre Neo- plasien</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Osteom, Osteosarkom, Chondrom, Chondrosar- kom, Fibrom, Fibrosar- kom ➡ Symptomatik je nach Art, Lokalisation und biologischem Verhalten	Alle Tierarten, Mensch
<i>Sekundäre Neoplasien</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Knochenmetastasen (beispielsweise das pul- monale Adenokarzinom als Primärtumor) 	Alle Tierarten, Mensch

<i>Zystische Läsionen</i>	<p>➡ Osteolysen, Frakturen, Hypercalzämie je nach Art und Lokalisation</p> <p>• fehlerhafte enchondrale Ossifikation (subchondrale Zysten), unbekannte Ursache (einfache und aneurysmatische Zysten)</p> <p>➡ Stabilitätsverlust, Fraktur bei mechanischer Beanspruchung</p>	Alle Tierarten, Mensch
----------------------------------	--	------------------------

2.1.4.1 Knochenfrakturen

Frakturen der Knochen werden in zwei Kategorien unterteilt. Zum einen in pathologische Frakturen, aufgrund einer Vorschädigung der Knochenstruktur durch beispielsweise Osteodystrophien, Neoplasien oder Knochenzysten und zum anderen in traumatische Frakturen, aufgrund einer zu großen Einwirkung mechanischer Kräfte (McGavin & Zachary, 2009). Die Therapie richtet sich nach der Lokalisation, Art und Stellung der Fraktur.

Eine konservative Therapie verzichtet auf einen operativen Eingriff, zieht jedoch eine längere Immobilisationszeit mit externer Schienung sowie eine schlechtere Möglichkeit der Reposition nach sich (Vogel, 2015).

2.1.4.2 Knochenfrakturheilung

Die Knochenfrakturheilung erfolgt in mehreren Einzelschritten und kann in eine primäre und sekundäre Frakturheilung unterteilt werden. Ohne Komplikationen wie Infektionen, eine Verschiebung der Fraktarenden oder eine inadäquate Blutversorgung, erfolgt idealerweise eine direkte Knochenheilung *per primam intentionem* über die Bildung von Lamellenknochen (McGavin & Zachary, 2009).

Hierbei bedarf es jedoch einer zeitnahen Fixation mit kongruenter Apposition der Fraktarenden. Bei Knochendefekten mit einer Breite des Frakturspaltes von über 1 mm, spricht man von einer indirekten oder sekundären Frakturheilung, welche mit der Bildung von Geflechtknochen und einer damit verbundenen Kallusbildung einhergeht (McGavin & Zachary, 2009).

Die Schädigung des Periosts, Nekrosen im Knochenmark durch eine eingeschränkte Blutgefäßversorgung sowie eine ausgeprägte Hämatombildung im Frakturbereich, führen zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie dem Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), dem Plättchenfaktor und dem Transforming growth factor- β (TGF- β) durch Makrophagen und Thrombozyten (McGavin & Zachary, 2009). Daraufhin entsteht sowohl durch mesenchymale Zellen, welche Kollagen produzieren und sich in Osteoblasten zur Produktion

der Knochenmatrix differenzieren als auch durch Gefäßeinsprossungen in das Hämatom Granulationsgewebe. Nach 36 Stunden kann erster Geflechtknochen nachgewiesen werden, welcher sich nach vier bis sechs Wochen zu einem primären Kallus organisiert und entweder ausgehend von den Frakturende[n] samt Endost oder dem Periost gebildet wird (McGavin & Zachary, 2009).

Osteoklasten ermöglichen durch eine Remodellierung eine Formanpassung des neu gebildeten Knochengewebes in den Frakturspalt. Erst nach Monaten bis Jahren kommt es zur Remodellierung und Entstehung eines festen, lamellaren Knochens. Bei dauerhaften Komplikationen wie einer Verschiebung der Frakturende[n] kann ein Kallus bestehen bleiben, welcher zeitlebens den Frakturspalt überbrückt und es kommt zur Bildung einer Pseudarthrose (McGavin & Zachary, 2009). Einflussfaktoren auf die Frakturheilung sind das Alter des Patienten, die Lokalisation der Fraktur, die Stellung und Apposition der Frakturende[n], Infektionen, die Innervierung des Frakturgebietes sowie die Vaskularisation und Stabilität der Fraktur (Hecht, 2008).

2.1.4.3 Chirurgisches Management von Knochenfrakturen

Chirurgisch können intra- und extraossäre Osteosynthesen erfolgen. Intraossär kann zum Beispiel ein Marknagel

eingesetzt werden. Extraossär kann die Fraktur beispielsweise mittels Plattenosteosynthesen, verschiedenen Schraubenarten, Bohr- und Spickdrähten, Zuggurtungen mit Drahtschlingen oder Fixateure externe versorgt werden (Keating *et al.* 2005; Vogel, 2015; Schemitsch, 2017).

Um Komplikationen bei der Frakturheilung zu verhindern, kann bei größeren Frakturspalten die Transplantation allogenen oder autologen Knochens notwendig werden, wofür jedoch eine optimale Durchblutung eine Voraussetzung für das Einwachsen des Transplantats darstellt (Vogel, 2015). Genutzt werden kann hierbei der Knochen des Beckenkammes, des Tibiakopfes, der Rippe oder des Radius (Gazdag *et al.* 1995; Keating *et al.* 2005; Schemitsch, 2017).

Dabei besteht jedoch das Risiko einer ungenügenden Transplantatintegration oder einer Abstoßungsreaktion seitens des Empfängers. Nachteilig ist auch die geringe Materialverfügbarkeit (Banwart *et al.* 1995; Keating *et al.* 2005). Die Verpflanzung eines Organs zwischen zwei genetisch verschiedenen Individuen zieht ohne eine immunsuppressive Therapie immer eine Immunreaktion nach sich (Souza-Offtermatt *et al.* 2004). Eine akute Abstoßungsreaktion zeigt sich durch Fieber, Schwellung, Schmerzen und einem Funktionsverlust des Transplantats. Diese akute Reaktion tritt laut Souza-Offtermatt *et al.* (2004) häufig innerhalb von vier bis

fünf Tagen nach der Transplantation auf, kann jedoch auch erst nach einem bis drei Monaten auftreten und ist T-Zell vermittelt. Ohne eine immunsuppressive Therapie, durch beispielsweise Steroide, können strukturelle Veränderungen des Transplantates entstehen. Wird die Immunreaktion chronisch, bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe, welche zu Gefäßveränderungen und einer anschließenden Minderperfusion des Transplantates führen. Die chronische Form der Abstoßung kann nur geringgradig über Immunsuppressiva therapiert werden (Souza-Offtermatt *et al.* 2004). Für den Spender können auch Komplikationen an der Entnahmestelle auftreten. Neben Wundinfektionen, Schmerzen oder der chirurgischen Verletzung von Nerven und Gefäßen besteht auch das Risiko einer Instabilität oder Fraktur der Entnahmestelle (Banwart *et al.* 1995). Daher ist die Zielsetzung ein geeignetes Biomaterial zu finden, welches die Heilungschancen größerer Knochendefekte und die Wiederherstellung der strukturellen Integrität deutlich verbessert (Gazdag *et al.* 1995).

2.2 *Knochen Tissue Engineering*

Die Risiken der autologen und allogenen Knochentransplantation (Banwart *et al.* 1995; Keating *et al.* 2005) bei der chirurgischen Therapie größerer Knochendefekte,

weckten den Bedarf an Transplantatmaterialien, welche osteokonduktiv und osteoinduktiv sind sowie osteogene Zellen beinhalten (Gazdag *et al.* 1995). Je nach strukturellen und biochemischen Eigenschaften des verwendeten Materials kann die klinische Anwendung variieren (Gazdag *et al.* 1995).

2.2.1 Biofabrikationstechniken

Durch eine Technik, wie beispielsweise dem dreidimensionalen (3D) -Druck, besteht inzwischen die Möglichkeit Biomaterialien zielgerichtet zu formen und größere, komplexere Strukturen herzustellen (Basara *et al.* 2019). Auch das Verfahren der Mikroverkapselung schafft verschiedene Optionen der biomedizinischen Anwendung durch eine Verkapselung von Zellen (Sarker *et al.* 2014).

2.2.1.1 Verkapselung

Bei der Mikroverkapselung werden Hydrogele, wie beispielsweise Alginat-Dialdehyd-Gelatine (ADA-GEL), durch eine pneumatische Extrusion in eine Calciumchlorid-Lösung appliziert und durch Gelierung in Kapselform gebracht (Sarker *et al.* 2014). Vor der Kapselherstellung können dem Hydrogel Zellen wie mesenchymale Stammzellen (MSCs) hinzugefügt und im Gel verkapselt werden (Steiner *et al.* 2018). Die Einbettung von zu implantierenden Zellen in Hydrogele bringt

zum einen den Vorteil mit sich, dass Hydrogele für Nährstoffe und Sauerstoff aufgrund ihrer Porosität durchlässig sind (Ausländer *et al.* 2012). Zum anderen bilden Hydrogele eine Schutzschicht vor mechanischen Stressoren oder immunologischen Einflüssen des Empfängers (Wilson *et al.* 2014).

2.2.1.2 *Bioprinting*

Das Bioprinting schafft die Möglichkeit aus einer am Computer erstellten Form schichtweise ein dreidimensionales Modell eines zu druckenden Biomaterials herzustellen (Fastermann, 2012). Dabei gibt es verschiedene Techniken wie beispielsweise den Tintenstrahldruck, den Druck mittels Extrusionsverfahren, den Laser assistierten Druck oder den Druck mittels digitaler Lichtverarbeitungs-Technologie (Zhu *et al.* 2016). Die Unterschiede zwischen den Drucktechniken wurden bereits mehrfach beschrieben (Kumar & Kim, 2020; Liu *et al.* 2017a; Negro *et al.* 2018; Zhu *et al.* 2016).

Doch nicht nur das Drucken von Hydrogelen ist möglich sondern auch von verschiedenen Hartmatrices und Polymeren wie beispielsweise dem Polydimethylsiloxan (PDMS), welches Schicht für Schicht zu einer komplexen Gussform verarbeitet werden kann (Biggemann *et al.* 2020). So beschreiben Biggemann *et al.* (2020) eine Gussform welche durch einen

Stereolithographie 3D-Drucker (Digitalwax® 028J, DWS S.r.l. Zanè, Italy) aus PDMS hergestellt wurde. Diese Form diente als „negative“ Vorlage für die Weiterverarbeitung von HA mittels Spritzgussverfahren. Vorteilhaft wirkte sich hierbei die glattere Oberfläche des HAs im Gegensatz zu einer direkt gedruckten Form aus (Biggemann *et al.* 2020).

Das Verfahren der Stereolithographie wurde 1986 von Chuck Hill entwickelt (Fastermann, 2012). Für den 3D-Druck muss vorab die zu druckende Form durch verschiedene Programme in einer Volumenzeichnung erstellt werden. Diese Zeichnung wird zum Beispiel in eine Standard Triangulation Language (STL)-Datei umgerechnet, durch welche der 3D-Drucker die Richtungen (Vektoren) der zu druckenden Schichten im Raum berechnen kann. Anschließend wird schichtweise, entlang der räumlichen X-, Y- und Z-Achse, ein flüssiges Photopolymer (lichtaushärtender Kunststoff) gedruckt und durch einen Laser ausgehärtet (Fastermann, 2012).

Biggemann *et al.* (2020) beschrieben eine Kombination der gedruckten Formen mit einem Spritzgussverfahren, welche zukünftig die individuelle Anfertigung einer großen Menge an baugleichen Formen mittels vorheriger CT-Aufnahmen ermöglichen kann. Dieses Verfahren bringt somit den Vorteil mit sich, dass die Formen jederzeit in ihrer Größe und Porosität modifiziert werden können (Biggemann *et al.* 2020).

Das Bioprinting bietet auch vielversprechende Möglichkeiten der zukünftigen, klinischen Anwendung auf dem Gebiet der Wundheilung. Das Bioprinting von Hydrogelschichten als Hautäquivalent wurde von Zhao *et al.* (2016) und He *et al.* (2018) untersucht. Zhao *et al.* (2016) verwendeten eine Biomatrix aus Gelatine und Methacrylat (GelMa), welche als dreidimensionale Trägermatrix fungierte und somit die Züchtung einer Epidermis *in vitro* ermöglichte. Hierfür wurde eine spontan immortalisierte humane Keratinozytenzelllinie verwendet, welche auf dem GelMa angezüchtet wurde. Das Bioprinting wurde hierbei als vielversprechendes Verfahren für die zukünftige Regeneration größerer Hautdefekte beurteilt (Zhao *et al.* 2016).

2.2.2 Biomaterialien

Die Kerneigenschaften und Ansprüche an Biomaterialien sind ein Zusammenspiel aus einer guten Biokompatibilität, einer der Extrazellulärmatrix ähnlichen Beschaffenheit, einer Funktion als Zellträger, den mechanischen Eigenschaften wie der Stabilität sowie einer Förderung der Geweberegeneration (Lee *et al.* 2014; Yu *et al.* 2015; Guan *et al.* 2017). Auch sollte ein Zusammenspiel der Degeneration des Biomaterials und der Gewebekonstruktion bestehen (Steiner *et al.* 2018 zitiert nach Glass *et al.* 2016). Eigenschaften wie eine Osteoinduktivität, was eine

direkte Stimulation der Osteogenese bedeutet und eine Osteokonduktivität, als eine passive Funktion des Biomaterials als Stützgerüst sind für das Einwandern mesenchymaler Stammzellen von Bedeutung (Dietz *et al.* 2003).

2.2.2.1 Hydrogele

Hydrogele sind 3D-Netzwerke aus hydrophilen Polymeren, welche sich aufgrund ihrer Äquivalenz zur Extrazellulärmatrix und der mechanischen Eigenschaften besonders gut für das Tissue Engineering und als Zellträger eignen (Guan *et al.* 2017). Kovalente oder inter- und intramolekulare Bindungen halten die Hydrogele mit einem hohen Wassergehalt stabil (El-Sherbiny & Yacoub, 2013). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wurde die Verwendung von Hydrogelen wie beispielsweise Hyaluronsäure (Rath *et al.* 2012), Fibrin (Arkudas *et al.* 2009b), ADA-GEL (Steiner *et al.* 2018) oder Kollagen (Klumpp *et al.* 2012) als Trägermatrizes für Zellen und Wachstumsfaktoren untersucht.

So implantierten Klumpp *et al.* (2012) elektrogesponnenes Poly-ε-Caprolacton (PCL) mit Kollagen, im Vergleich zu parallel angeordneten PCL-/ Kollagen-Fasern im AV-Loop-Modell der Ratte. Das AV-Loop-Modell ist ein Angiogenesemodell nach Erol und Spira (1979), in welchem die Gefäße am medialen Oberschenkel mittels eines

Veneninterponats des kontralateralen Oberschenkels zu einer Gefäßschleife anastomosiert werden. Die Implantation durch Klumpp *et al.* (2012) führte zu einer Bildung neuen fibrovaskulären Gewebes im Konstrukt, welches aber teilweise keine Unterscheidung zwischen den neu gebildeten Kollagenfasern und dem implantierten Kollagen zuließ. Die Auswertung der Vaskularisation ergab, dass ein paralleler Faserverlauf innerhalb der Trägermatrix zu einer besseren Vaskularisation führte als ein ungeordneter Faserverlauf.

Rath *et al.* (2012) kombinierten Fibrin mit Hyaluronsäure und dem Polymer Poly-L-DL-Lactic Acid (PLDLLA)- β -Tricalciumphosphat (β -TCP) -PCL und verwendeten die Hydrogel-Polymermatrix als Träger für eine Osteoblasten-ähnliche Sarkom-Zelllinie im AV-Loop-Modell. Durch die Implantation wurde eine Vaskularisation der Konstrukte erreicht. Die Matrix wies eine gute Biokompatibilität auf, jedoch degenerierte die Hyaluronsäure deutlich langsamer als das Fibrin. Das Fibrin war nach vier Wochen bereits vollständig abgebaut und durch fibrovaskuläres Gewebe ersetzt, wohingegen die Hyaluronsäure Matrix nach acht Wochen noch vorhanden war (Rath *et al.* 2012).

Fibrin gibt es sowohl als kommerziell verfügbares Thrombin und Fibrinogen, wie das Tisseel® (Baxter Healthcare S.A.), als auch als Plasma isoliertes Fibrinogen (Noori *et al.* 2017).

Nachteilig sind jedoch eine Varianz sowie eine immunologische Unterscheidung im spenderabhängig gewonnenen Fibrinogen (Noori *et al.* 2017). Die manuelle Applikation des kommerziell verfügbaren Tisseels® kann nach Herstellerprotokoll (Baxter Healthcare S.A.) erfolgen (Arkudas *et al.* 2009b; Buehrer *et al.* 2015). Im Falle des Tisseels® werden bei der Applikation Fibrinogen und Thrombin miteinander vermengt. Bei der Vermengung spaltet das Thrombin proteolytisch zwei Fibrinopeptide A und B des Fibrinogens ab, weshalb es zur Bildung von viskösen Fibrinmonomeren kommt (McGavin & Zachary, 2009).

Um eine Fibrinolyse zu verlangsamen wurde dem Fibrinogen vor der Applikation Aprotinin, ein Proteaseinhibitor, in einer Konzentration von 1500 Kallikrein Inhibitor Units (K.I.U.) /ml beigemengt (Arkudas *et al.* 2007b; Arkudas *et al.* 2009b).

Polykandriotis *et al.* (2008) verwendeten eine Konzentration von 33,7 mg/ml Fibrinogen und 25 International Units (I.U.) /ml Thrombin als Biomaterial implantiert in eine Teflonkammer im AV-Loop-Modell der Ratte. Die Auswertung ergab, dass eine Konstruktvascularisation eng mit dem Abbau der Fibrinmatrix korrelierte und daher die verwendete Fibrinkonzentration die Angiogenese negativ beeinflusste.

Arkudas *et al.* (2007b) verwendeten Fibrinogen in einer Konzentration von 10 mg/ml und Thrombin in einer

Konzentration von 2 I.U. /ml sowie 1500 K.I.U. /ml Aprotinin. Die Matrix wurde in einer Teflonkammer im AV-Loop-Modell der Ratte sowohl mit als auch ohne die Zugabe des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) und basic Fibroblast Growth Factors (bFGF) für eine Dauer von zwei und vier Wochen implantiert. Durch die niedrigere Fibrinogenkonzentration wurden die Fibrinolyse sowie die Vaskularisation der Matrix beschleunigt. Die Wachstumsfaktoren führten zu einer Steigerung der Angiogenese und zu einer vermehrten Konstruktschrumpfung

Arkudas *et al.* (2009b) verwendeten zwei Gruppen unterschiedlicher Fibrinogen Konzentrationen. Zum einen eine Konzentration von 10 mg/ml und zum anderen eine Konzentration von 40 mg/ml Fibrinogen. Thrombin wurde jeweils in einer Konzentration von 2 I.U. /ml verwendet. Das Fibrin wurde in unterschiedlicher Gruppenaufteilung mit den Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF, in einer Teflonkammer subcutan (s.c.) in einer Rückenhauttasche der Ratte implantiert. Hierbei wurde die Haut lateral der Wirbelsäule chirurgisch eröffnet, Hauttaschen präpariert und die Kammer entweder mit der Öffnung nach oben, unfixiert platziert oder mit der Öffnung nach unten, an der Muskulatur fixiert. Die Hauttaschen wurden anschließend mit Nähten verschlossen (Arkudas *et al.* 2009b). Nach einer Implantationszeit von 14 Tagen war das Fibrin fast

vollständig resorbiert, wenngleich die unterschiedlichen Fibrinogenkonzentrationen keinen Einfluss auf die Vaskularisation oder die Degeneration der Matrix hatten. Auch zeigten die Ratten keine Anzeichen postoperativer Komplikationen wie Hämatome, Infektionen oder Nahtdehiscenzen. Jedoch schlussfolgerten Arkudas *et al.* (2009b), dass eine Verdünnung von Fibrinogen leichter in der Anwendung war. Ausschlaggebend für die Fibrinstruktur und Formgebung bei der Koagulation ist der Einfluss des Thrombins auf das Fibrinogen bei der Applikation (Arkudas *et al.* 2009b zitiert nach Wolberg 2007).

Die Implantation von Fibrin, HA und β -TCP mit MSCs aus dem Knochenmark der Ratte, führte in Kombination mit dem Wachstumsfaktor BMP-2 zu einer Knochenneubildung im AV-Loop-Modell (Buehrer *et al.* 2015). Hierbei wurde das Fibrinogen auch in einer Konzentration von 10 mg/ml und Thrombin in einer Konzentration von 2 I.U. /ml verwendet. Nach sechs Wochen war das Fibrin vollständig aufgelöst und durch neu gebildetes fibrovaskuläres Gewebe ersetzt. Die HA-/ β -TCP-Matrix zeigte keine Anzeichen einer Degeneration, jedoch bildete sich das neu gebildete Gewebe die Matrix mit einer Porengröße von 300 – 600 μ m umschließend. Die Knochenbildung war hauptsächlich zentral auf die Bereiche um den AV-Loop herum begrenzt, erreichte nach sechs Wochen

jedoch eine Fläche von $9.18 \pm 5.3 \text{ mm}^2$ in der Gruppe welche BMP-2 beinhaltete, im Vergleich zur Gruppe mit ausschließlich MSCs ($0.03 \pm 0.09 \text{ mm}^2$). Die Implantation von ADA-GEL in Form von Mikrokapseln mit MSCs aus dem Knochenmark der Ratte führte im AV-Loop-Modell der Ratte nach vier Wochen zu einer Vaskularisation der implantierten Konstrukte (Steiner *et al.* 2018). Festgestellt wurde auch, dass die Biodegeneration der ADA-GEL Kapseln im Vergleich zu dem von Arkudas *et al.* (2007b) verwendeten Fibrin, deutlich erniedrigt war. Obwohl sich die Biodegeneration der ADA-GEL Kapseln durch eine Verkapselung der MSCs signifikant erhöhen ließ, wurden innerhalb der Mikrokapseln keine vaskulären Strukturen nachgewiesen. Auch eine Knochenbildung wurde in keiner der Gruppen detektiert (Steiner *et al.* 2018).

2.2.2.2 Spinnenseiden

Die Verwendung von rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteinen wie dem eADF4(C16) ist ebenfalls möglich. Dieses Protein ist in der Seide der mitteleuropäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* enthalten und zeichnet sich besonders durch seine Biokompatibilität und mechanische Festigkeit der daraus hergestellten Fasern aus (Zeplin *et al.* 2014). Trägermatrizes aus Seidenproteinen sind biologisch abbaubar (Salehi *et al.* 2020) und für eine Zellimplantation

geeignet, da zwischen den Faserbündeln eine gleichmäßige Zelladhäsion möglich ist (Johansson *et al.* 2019).

Zeplin *et al.* (2014) führten eine Studie mit dem Ziel durch eine immunologische Toleranz nach der Implantation medizinischer Silikonimplantate zu erreichen. Es wurde ein Silikonimplantat mit einer Beschichtung aus dem rekombinant hergestellten Spinnenseidenprotein eADF4(C16) in eine Rückenhauttasche der Ratte, s.c., für drei, sechs und 12 Monate implantiert. Die Spinnenseidenproteine konnten bis zu 12 Monate auf den Implantaten nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich besonders in den ersten Monaten nach der Implantation eine gute Biokompatibilität der beschichteten Silikonimplantate, durch die Abwesenheit von postoperativen Entzündungen oder Fibrosen¹.

Johansson *et al.* (2019) untersuchten *in vitro* eine Matrix aus dem rekombinanten Spinnenseidenprotein 4RepCT, hergestellt von dem Bakterium *Escherichia coli*, in der Kokultivierung mit verschiedenen Zellarten wie beispielsweise Endothelzellen. 4RepCT wurde vorab mit Fibronektin kombiniert, um die Zelladhäsion zu unterstützen. Die Ergebnisse zeigten, dass das Biomaterial die Zelladhäsion unterstützte, das Zellüberleben förderte und die Seidenmikrofasern stabil, aber dehnbar

¹ Bei chronischen Entzündungen auftretendes, überschießendes Bindegewebe mit narbigen Kontrakturen (McGavin & Zachary, 2009)

blieben. Neben Fibronectin können Spinnenseiden beispielsweise mit der Aminosäuresequenz RGD, bestehend aus den Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure, modifiziert werden. Hierdurch wurde eine Steigerung der initialen Adhäsionskapazität erzielt, was für eine zelluläre Besiedlung bedeutsam war (Salehi *et al.* 2020 zitiert nach Widhe *et al.* 2013).

Die Modifikation der eADF4(C16) Spinnenseide, durch Kombination mit einer RGD-Sequenz, konnte *in vitro* in einem Schaum aus eADF4(C16) Spinnenseide zu einer besseren Zellverteilung und Zelladhäsion führen (Salehi *et al.* 2020 zitiert nach Schacht *et al.* 2016). Auch die Zellproliferation wurde durch eine Modifikation der eADF4(C16) Spinnenseide mit einer RGD-Sequenz gesteigert (Wohlrab *et al.* 2012). Eine s.c. Implantation von 4RepCT in eine Rückenhauttasche von Ratten durch Fredriksson *et al.* (2009) zeigte nach einer Woche die Anwesenheit von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und Leukozyten, was auf eine Fremdkörperreaktion schließen ließ. Fünf der 18 Ratten zeigten ein Erythem um das implantierte Biomaterial. Die Implantationsdauer betrug jedoch nur eine Woche, weshalb Fredriksson *et al.* (2009) von einer nur initialen Immunreaktion auf das implantierte Material ausgingen, da in der Kontrollgruppe aus dem Nahtmaterial Mersilk™ die gleichen

Zellen nachzuweisen waren. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte jedoch das 4RepCT die Ausbildung vaskulärer Strukturen verzeichnen.

Lovett *et al.* (2010) verwendeten Gefäßtransplantate aus Polytetrafluorethylen (PTFE) und Seide im Vergleich, welche zur Quantifizierung der Thromboserate in eine End-zu-End-Anastomose der Bauchaorta von Ratten implantiert wurden. Nach vier Wochen zeigte sich, dass die Gefäßtransplantate aus Seide, welche Seidenfibroin enthielten, zu einer geringeren Thromboserate führten als die PTFE-Transplantate.

2.2.2.3 *Metall-basierte Hartmatrices*

Metall-basierte Matrices, wie beispielsweise Titan (Takemoto *et al.* 2005) oder Edelstahl (Jiang *et al.* 2018) wurden aufgrund ihrer Stabilität in Knochendefektmodellen, guten Biokompatibilität und möglichen Formadaption häufig verwendet. Arkudas *et al.* (2012) und Buehrer *et al.* (2015) zeigten, dass die Verwendung einer porösen Titankammer im AV-Loop-Modell eine Verbindung der extrinsischen (vom Gefäßsystem der Ratte ausgehenden) und der intrinsischen (vom AV-Loop ausgehenden) Gefäßstrukturen ermöglicht. Im direkten Vergleich zu einer Kammer aus Polytetrafluorethylen (PTFE, Handelsbezeichnung: Teflon®) konnten Weigand *et al.* (2015) im AV-Loop-Modell des Schafes zeigen, dass die poröse

Titankammer durch die Zellmigration in das umliegende Gewebe zu einer besseren Degeneration des implantierten Biomaterials führte.

2.2.2.4 Synthetische Polymere und Wachstumsfaktoren

Synthetische Polymere wie PTFE (Arkudas *et al.* 2009b), PCL (Gniesmer *et al.* 2019), Polyglycerin-Sebacat (PGS) (Luginina *et al.* 2020) oder Polymethylmethacrylat (PMMA) (Son *et al.* 2013) finden in verschiedenen Fabrikations- und Kombinationsmöglichkeiten Anwendung im Tissue Engineering (Sousa *et al.* 2013; Zheng *et al.* 2017). Sie haben den Vorteil, dass einige Polymere biologisch abbaubar sind (Luginina *et al.* 2020). Zur Steigerung der hydrophilen Eigenschaften und der Zelladhäsion wurde PCL mit Hydrogelen wie Kollagen (Sousa *et al.* 2013) oder Gelatine (Hu *et al.* 2019) kombiniert.

Arkudas *et al.* (2007b) implantierten die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF im Rattenmodell. In niedrigen Konzentrationen konnten die im Fibrin-Gel immobilisierten Wachstumsfaktoren die Gefäßanzahl sowie die Bildung fibrovaskulären Gewebes in einer s.c. implantierten Teflonkammer signifikant erhöhen. Diese Steigerung zeigte sich jedoch nicht mehr bei höheren Wachstumsfaktorkonzentrationen. Die Implantation des Wachstumsfaktors

BMP-2 führte in Kombination mit HA, β -TCP, Fibrin und MSCs zu einer signifikant verstärkten Knochenneubildung im AV-Loop-Modell der Ratte (Buehrer *et al.* 2015). Jedoch nahm die Gefäßanzahl im Gegensatz zu einer alleinigen Implantation der MSCs oder des BMP-2 mit den Biomaterialien nach sechs bis 12 Wochen ab.

Die Wachstumsfaktoren stimulieren physiologisch die Differenzierung induzierbarer, mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark zu Osteoblasten und deren Einwanderung in den Knochen. BMP-2 wird zudem selbst durch Osteoblasten gebildet, um die Osteoklasten für die Knochenremodellierung zu aktivieren (Speckmann *et al.* 2019). Untersuchungen zu klinischen Fallstudien haben vermehrte postoperative Komplikationen wie Wunddehiszenzen (Cahill *et al.* 2009), Hämatome und Entzündungen bei einer Verwendung von rekombinantem humanem BMP-2 im Halswirbelsäulenbereich festgestellt (Shields *et al.* 2006; Tannoury & An, 2014).

2.2.2.5 Biokeramiken

HA kommt physiologisch in 65 % der anorganischen Knochensubstanz vor (McGavin & Zachary, 2009). Aufgrund seiner Biokompatibilität, interstrukturellen Festigkeit und osteokonduktiven Wirkung ist HA ein geeignetes Biomaterial,

welches seit vielen Jahren erfolgreich implantiert wird (Buehrer *et al.* 2015; Holmes *et al.* 1987; Holmes *et al.* 1988; Ito *et al.* 2008). Durch den 3D-Druck einer Gussform aus PDMS kann das HA mittels Spritzgussverfahren in eine bestimmte Form gebracht werden. Diese Formgebung ermöglicht eine individuelle, an die Knochendefektform angepasste Implantation des HA (Biggemann *et al.* 2020). Die osteokonduktiven Eigenschaften des HA führen dazu, dass mesenchymale Zellen in das mechanische Stützgerüst des HA einwandern können (Dietz *et al.* 2003).

Allerdings wurde für monolithisches HA auch eine schlechte Bruchfestigkeit beschrieben, weshalb eine hohe Porosität die Verwendung des HA als mechanisch beanspruchtes, tragendes Material negativ beeinflussen könnte (Biggemann *et al.* 2020). Ito *et al.* (2008) zeigten bei einer Implantation von interporösem HA und Chondrozyten in die Patellarrille von Kaninchen eine Knochenbildung in der implantierten Matrix nach 12 Wochen. Holmes *et al.* (1987) implantierten HA und autogenen Knochen des *Os Ilium* in einen distalen Radiusdefekt von Hunden für bis zu 48 Monate. Nach drei Monaten konnte in beiden Gruppen bereits eine Knochenbildung detektiert werden. Hierbei zeigte sich, dass in den HA Konstrukten früher Knochengewebe nachgewiesen werden konnte, sie jedoch nach 48 Monaten keine Anzeichen einer Degeneration zeigten. Die

Knochenbildung stieg bis auf 73 % der Konstruktfläche. Weitere Keramiken sind das β -TCP oder eine Kombination aus β -TCP und HA, bezeichnet als Biphasisches Calciumphosphat (BCP), welche für das Knochen Tissue Engineering verwendet werden konnten (Buehrer *et al.* 2015; Yuan *et al.* 2010).

Als Matrices wurden diese Keramiken auch aufgrund ihrer osteokonduktiven Eigenschaften und ihrer strukturellen Stabilität eingesetzt (Ito *et al.* 2008; Yuan *et al.* 2010). Knochenersatzmaterialien gibt es auch als vorgefertigte, kommerziell verfügbare Medizinprodukte.

Das NanoBone® (SpongioTech, ARTOSS GmbH, Rockstock, Deutschland), Tricos® (Baxter Healthcare S.A., USA) oder BioOss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Schweiz) finden unter anderem bereits in der Implantologie Anwendung (Seifi *et al.* 2015). NanoBone® ist ein synthetisches Knochenersatzmaterial aus HA und einer Silikagelmatrix (Punke *et al.* 2012). Tricos® besteht zu 60 % aus HA und zu 40 % aus β -TCP (Buehrer *et al.* 2015). Das BioOss® ist hingegen ein natürliches Knochenersatzmaterial aus bovinem Knochen (Liu *et al.* 2011). Sowohl für den Einsatz *in vivo* als auch *in vitro* konnten für diese Materialien osteokonduktive Eigenschaften und eine gute Biokompatibilität gezeigt werden (Buehrer *et al.* 2015; Liu *et al.* 2011; Punke *et al.* 2012). So zeigten Liu *et al.* (2011) bei einer Kultivierung von humanen Osteoblasten *in vitro*, dass

sowohl NanoBone[®] als auch BioOss[®] eine geringe Zytotoxizität aufweisen und die Proliferation der Zellen gefördert wurde. Dies stand jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen von Arkudas *et al.* (2007a), welche nach einer Implantation von Osteoblasten, Fibrin und einer porösen Matrix aus spongiösem Rinderknochen in Ratten eine deutliche Fremdkörperreaktion feststellten.

Punke *et al.* (2012) implantierten NanoBone[®] in die *Bulla tympanica*² von 20 Meerschweinchen mit dem Ziel, nach einer chronischen Mittelohrentzündung mit chirurgischer Eröffnung des Mastoids³ die entstandene Mastoidhöhle mit Knochenersatzmaterial zu füllen. Es konnte nach vier Wochen eine Neubildung von Knochen nachgewiesen werden. Nach einer Implantation von HA/β-TCP, Fibrin und MSCs konnte im AV-Loop-Modell der Ratte neu gebildetes Knochengewebe detektiert werden (Buehrer *et al.* 2015).

Auch Weigand *et al.* (2015) konnten nach einer Implantation von HA/β-TCP (NanoBone[®]) in eine Teflon- und Titankammer im AV-Loop-Modell des Schafes eine Knochenbildung nach 18 Wochen nachweisen. Wohingegen es nach einer kürzeren

² knöcherner Teil des *Os temporale* (Schläfenbein), auch Paukenblase genannt, bildet den Boden und Seitenteile der Paukenhöhle als Teil des Mittelohres (König & Liebich, 2014)

³ Warzenfortsatz oder *Processus mastoideus*, knöcherner Teil des Schläfenbeins (König & Liebich, 2014)

Implantationszeit von nur sechs Wochen nur in der Hälfte der Konstrukte zu einer Gewebeneubildung kam. Auch nach einer 12- bis 18-wöchigen Implantationszeit waren noch 20 % des implantierten NanoBone® Materials nachweisbar.

Das 45S5 Bioglass®, als bioaktive Glaskeramik, wurde 1969 entwickelt (Hench, 2006) und bereits *in vivo* (Arkudas *et al.* 2013) implantiert. *In vitro* unterstützte das 45S5 Bioglass® die Adhäsion und Proliferation von Osteoblasten (Chen *et al.* 2008) und bewirkte auch eine Steigerung der Angiogenese (Day *et al.* 2004). Trotz der osteokonduktiven Eigenschaften führte das 45S5 Bioglass® im AV-Loop-Modell nach dreiwöchiger Implantation nicht zu einer Knochenbildung, Biodegeneration oder wesentlichen Steigerung der Konstruktvascularisation (Arkudas *et al.* 2013). Jedoch hat eine Kombination des 45S5 Bioglass® mit Wachstumsfaktoren, humanen Stammzellen der Zahnpulpa und einer achtwöchigen Implantation bereits zu einer Bildung von Mikrogefäßen geführt (El-Gendy *et al.* 2015).

2.2.3 *Implantation von Biomaterialien*

Für die Implantation von Biomaterialien in einer Kammer sind beispielsweise Kammern aus Titan (Buehrer *et al.* 2015) und Teflon® (Arkudas *et al.* 2009a) beschrieben worden.

Weigand *et al.* (2015) implantierten vergleichend beide

Kammertypen in das AV-Loop-Modell des Schafes. Dadurch, dass die Titankammer eine poröse Wand- und Bodenstruktur aufwies, war eine Verbindung zwischen den extrinsischen (von dem Gefäßsystem des Schafes ausgehenden) und den intrinsischen (von dem AV-Loop ausgehenden) Gefäßstrukturen möglich (Weigand *et al.* 2015). Die Interaktion des Kammerinhaltes mit dem umliegenden Gewebe wurde durch die isolierte Teflonkammer erschwert.

Schmidt *et al.* (2017) zeigten jedoch den Vorteil der isolierten Teflonkammer im AV-Loop-Modell der Ratte, indem sie das Veneninterponat der *V. femoralis* vor der Gefäßanastomose einer Bestrahlung aussetzten und den AV-Loop anschließend für 15 Tage in eine Fibrinmatrix einbetteten. Die kompartimentspezifische Quantifizierung des entstandenen Gefäßnetzwerkes konnte in der Teflonkammer isoliert erfolgen und zeigte eine geringere Gefäßsprossung nach einer Bestrahlung.

Ein weiteres Modell stellt das Femurkammermodell dar (Gniesmer *et al.* 2019). Bei diesem Modell wird das Biomaterial in eine Metallkammer mit Glasdeckel appliziert und durch Schrauben am Femur befestigt. Vorher erfolgte die Entfernung des *Trochanter Major*⁴. Hierdurch ist eine Beurteilung der

⁴ Knöcherner Vorsprung des proximalen Endes des *Os femoris*, dient als Ansatz der Kruppenmuskulatur (König & Liebich, 2014)

mikrohämodynamischen Parameter in Implantaten nahe des Femurs möglich. Ein Vorteil besteht darin, dass durch den Glasdeckel der Kammer eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie zur Beurteilung der zeitlichen Abfolge der Vaskularisation *in vivo* möglich ist (Tavassol *et al.* 2011).

Alieva *et al.* (2014) beschreiben weitere Modelle wie das Schädelkalotten-, Brustkammer- und Bauchkammermodell, welche eine intravitale Bildverarbeitung zu verschiedenen Zeitpunkten mittels einer Kammerfenestrierung ermöglichen. Das Schädelkalottenmodell mit einem cranialen Fenster kann über zwei verschiedene Methoden erfolgen. Für die erste Methode wird das Schädeldach eröffnet und anschließend ein fenestrierter Ring aus Titan platziert und mit einem Klebstoff befestigt (Brown *et al.* 2010; Alieva *et al.* 2014).

Alieva *et al.* (2014) beschrieben die Methodik angewandt von Grutzendler *et al.* (2002), bei welcher in einer Langzeitstudie die Strukturdynamik der Gehirnsynapsen von Mäusen beobachtet wurde. Hierfür wurde das Schädelkalottenmodell durch eine Ausdünnung des Schädeldachs, ohne die zusätzliche Platzierung eines Deckelglases, durchgeführt. Durch die ausgedünnte Schädeldecke kann das Gehirn optisch beurteilt werden. Allerdings bestand durch das Knochenwachstum eine zeitliche Limitierung (Alieva *et al.* 2014 zitiert nach Grutzendler *et al.* 2002).

Die von Alieva *et al.* (2014) beschriebenen Brust- und Bauchkammermodelle mit einer Fenestrierung ähneln sich in ihrer Durchführung. Nach der chirurgischen Hautinzision im Brust- oder Bauchbereich wird s.c. ein Titanring mit einem Deckelglas platziert und befestigt. Ebenfalls geeignet für eine intravitale Mikroskopie ist das dorsale Hautfaltenmodell, welches 1943 von Algire beschrieben wurde (Baron *et al.* 2011). Hierbei wurde eine fenestrierte Kammer am Rücken an einer Hautfalte befestigt und beispielsweise die Echtzeitbeurteilung eines Tumormodells bei Mäusen ermöglicht (Brown *et al.* 2010; Baron *et al.* 2011).

Schacht *et al.* (2004) verwendeten das Hautfaltenmodell beim Hamster, um das Vorhandensein eines Lymphgefäßnetzwerkes durch eine fenestrierte Titankammer zu beurteilen. Die Studie zeigte, dass das dorsale Hautfaltenmodell des Hamsters für Folgestudien am Lymphgefäßsystem geeignet ist, da ein Lymphgefäßsystem in der dorsalen Hautfalte des Hamsters, unter anderem durch Kontrastmittelinjektion und Lymphflussmessungen, nachgewiesen werden konnte.

Lehr *et al.* (1993) beschrieben das dorsale Hautfaltenmodell bei Mäusen als Möglichkeit einer intravitale Mikroskopie der Mikrozirkulation an der quergestreiften Hautmuskulatur und deren Anpassung an Ischämie und Reperfusion. Auch schlussfolgerten Lehr *et al.* (1993) darüber hinaus, dass der

Einfluss lokal oder systemisch wirksamer Arzneimittel und Wirkstoffe auf die Mikrozirkulation anhand dieses Modells untersucht werden kann. Lehr *et al.* (1993) beschreiben auch, dass Mäuse im Vergleich zu Hamstern aufgrund der anatomischen Gegebenheiten eines zwei- oder mehrschichtigen Hautmuskels, einer höheren Kapillardichte und eines reduzierten interkapillaren Abstandes, für die Beurteilung der mikrohämodynamischen Parameter besser geeignet sind. Limitierend war, dass die Qualität der Sichtbarkeit durch die Fenestrierung über die Implantationsdauer abnahm (Lehr *et al.* 1993).

In dem Rückenhautkammermodell wurde s.c., lateral der Wirbelsäule eine Kammer, welche vorab mit einem Biomaterial wie beispielsweise dem ADA-GEL gefüllt wurde, implantiert (Rottensteiner *et al.* 2014). Rottensteiner *et al.* (2014) implantierten an jeweils einer Ratte vier Teflonkammern, wovon zwei mit ADA-GEL Kapseln und zwei mit ADA-GEL und nano-Bioglass® gefüllt wurden. Eingesetzt wurde dieses Modell, um die Biokompatibilität für nachfolgende Knochen Tissue Engineering Studien zu eruieren. Es konnten eine Vaskularisation und gute Biokompatibilität der Materialien gezeigt werden, welche jedoch in keiner gruppenspezifischen Unterscheidung resultierten. Arkudas *et al.* (2009b) verwendeten das Rückenhautkammermodell als eine schnelle

und einfache Screening-Methode, um den Effekt der Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF in einer Fibrinmatrix an der Ratte zu beurteilen.

Des Weiteren gibt es auf dem Gebiet des Knochen Tissue Engineerings Knochendefektmodelle. Yuan *et al.* (2010) führten eine mehrstufige Materialtestung durch, in welchen Teile eines Knochens entfernt und diese durch eine implantierte Matrix ersetzt werden. Die Hartmatrizes HA, β -TCP und BCP wurden gemeinsam mit humanen MSCs s.c. in Hauttaschen von Ratten implantiert, um die Knochenneubildung zu untersuchen. Anschließend wurden die Materialien am spinalen Fusionsmodell von Hunden getestet. Hierfür wurde die Haut über den Dornfortsätzen der Lendenwirbel L3 und L4 inzidiert und der Knochen der Dornfortsätze mit einem Schaber verletzt (Yuan *et al.* 2010). Daraufhin erfolgten eine Platzierung und muskuläre Fixation der Materialien. Das *Os ilium*-Defektmodell des Schafes wurde anschließend durchgeführt. Die Haut über dem *Os ilium* sowie das Periost des Knochens wurden am Beckenkamm durchtrennt. Anschließend wurde ein Knochendefekt angelegt, welcher durch Implantate aus autologem Knochen (mit Knochen aus dem Defekt des gleichen Schafes), BMP-2 oder TCP gefüllt wurde (Yuan *et al.* 2010). Die Ergebnisse lassen sich dahingehend zusammenfassen, dass die implantierten Keramiken (HA, β -TCP und BCP) ebenso zu

einer Knochenbildung führten wie der autologe Knochen sowie das BMP-2. Auch wurden hierbei osteoinduktive Eigenschaften beschrieben (Yuan *et al.* 2010). Die Ergebnisse zeigten auch, dass eine Abnahme der Korngröße der implantierten Keramiken und eine Zunahme der Porosität, die Keramiken osteoinduktiv werden lässt (Yuan *et al.* 2010). Das Tibia-Defektmodell wurde von Kim *et al.* (2015) am Hund durchgeführt.

Die Haut über der Diaphyse sowie das Periost der Tibia wurden freipräpariert. Anschließend wurde ein Knochendefekt geschaffen. Eine Matrix aus porösem HA und Aluminiumoxid wurde in den Defekt eingebracht, der Defekt mit einer Edelstahlplatte fixiert und die Haut vernäht. Die Matrix unterschied sich dahingehend, dass die Hälfte der Konstrukte einen zentralen Bohrgang aufwies. Die Studie ergab, dass eine Knochenneubildung bei den Konstrukten mit einem zentralen Bohrgang im Gegensatz zu den Konstrukten ohne Bohrgang gesteigert war, was auf eine bessere Durchblutung zurückgeführt wurde (Kim *et al.* 2015).

Xia *et al.* (2013) führten das Femur-Defektmodell an Kaninchen durch. Hierbei wurden chirurgisch die Haut sowie die Muskulatur und das Periost über dem distalen Ende des Femurs inzisiert und ein Knochendefekt erzeugt. Anschließend wurden an die Defektgröße angepasste, poröse Zylinder aus PCL und PCL/HA in den Defekt für drei, sechs und neun

Wochen implantiert und die Wunde verschlossen. Die Ergebnisse zeigten eine gute Biokompatibilität und eine gesteigerte Knochenbildung bei den Konstrukten welche HA beinhalteten.

2.2.4 Zellimplantation

2.2.4.1 Mesenchymale Stammzellen

Nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* wurden MSCs auf dem Gebiet des Tissue Engineerings bereits mehrfach isoliert und implantiert (Buehrer *et al.* 2015; Zheng *et al.* 2017).

Zheng *et al.* (2017) kultivierten MSCs aus dem Knochenmark von Kaninchen mit 3D-gedruckten Trägermatrizes aus HA und PCL. Es konnte gezeigt werden, dass die MSCs zu einer Matrixmineralisierung und Hochregulation osteogener Marker wie der AP oder des Osteokalzins führten und in den Konstruktoren konnte eine Zelladhäsion nachgewiesen werden.

Buehrer *et al.* (2015) implantierten MSCs aus dem Knochenmark des Femurs und der Tibia von Ratten, in Kombination mit BMP-2 im AV-Loop-Modell. Durch die Implantation mit dem Wachstumsfaktor, HA/ β -TCP und Fibrin kam es zu einer Neubildung vaskularisierten Knochengewebes. Hierbei war die Verwendung von MSCs und BMP-2 ein entscheidender Faktor, da eine Implantation der restlichen

Biomaterialien ohne MSCs und BMP-2, oder eine Kombination mit VEGF, im AV-Loop-Modell zu keiner Knochenneubildung führte (Arkudas *et al.* 2010).

Auch implantierten Arkudas *et al.* (2007a) im AV-Loop-Modell Osteoblasten von Spenderratten und Fibrin in Empfängerratten, sechs Wochen nach der Implantation einer porösen Matrix aus spongiösem Rinderknochen. Die Materialien der Kontrollgruppe wurden s.c. ohne eine Prävascularisation implantiert. Nach vier und nach acht Wochen war das Zellüberleben der Osteoblasten in der prävascularisierten Matrix signifikant erhöht. Jedoch wurde in nur einer der prävascularisierten Matrices und in keiner der s.c. implantierten Matrices neu gebildetes Knochengewebe nachgewiesen. Außerdem zeigte sich, dass in den histologischen Schnitten beider Gruppen mehrkernige Riesenzellen vorhanden waren, was auf eine starke Fremdkörperreaktion der Empfängerratte auf die implantierte Matrix schließen ließ (Arkudas *et al.* 2007a).

Mehrkernige Riesenzellen entwickeln sich aus Makrophagen als Entzündungsinfiltrate. Bei einer Fremdkörperreaktion sind Makrophagen in einer Vielzahl nachweisbar, da sie für Lymphozyten Antigene präsentieren, um eine spezifische Immunantwort zu stimulieren (Noli *et al.* 2014).

MSCs sind in der Lage sich *in vitro* zu Chondroblasten,

Osteoblasten und Adipozyten zu differenzieren (Dominici *et al.* 2006). Auch waren ADSCs in der Lage sich in chondrogene, adipogene, endothel-ähnliche und osteogene Zellen zu differenzieren (Kern *et al.* 2006; Weigand *et al.* 2016b). Laut Dominici *et al.* (2006) sind weitere Kriterien, welche MSCs aufweisen, eine Expression der Oberflächenmarker Cluster of Differentiation (CD)105, CD73 und CD90 sowie eine Plastikadhärenz.

Mutschall *et al.* (2020) fanden heraus, dass ADSCs aus dem Fettgewebe in einer Analyse per Fluorescence-Activated-Cell-Sorter (FACS) positiv für die Oberflächenmarker CD73, CD90, und CD105 waren und eine Plastikadhärenz aufwiesen. Das FACS ermöglicht die Färbung von zellulären Oberflächenmarkern durch die Verwendung von gekoppelten Antikörpern und deren Analyse durch einen Laser. Hierbei können mehrere gefärbte Marker gleichzeitig analysiert werden (Augustin, 2004).

Noël *et al.* (2008) verglichen in einer *in vitro* Studie MSCs aus dem Knochenmark und ADSCs miteinander und stellten eine bessere Eignung zur osteogenen Differenzierung der MSCs fest. Jedoch konnte die leichtere Gewinnung der ADSCs auch überzeugen. Nach einer autologen Brustrekonstruktion konnten bereits geringe Mengen des überschüssigen s.c. Fettgewebes herangezogen werden, um differenzierungsfähige ADSCs zu

isolieren (Weigand *et al.* 2016b). Lin *et al.* (2010) geben an, dass aus einem Milliliter Knochenmark nur etwa 100-1000 MSCs, aus einem Gramm Fettgewebe jedoch bis zu 5000 ADSCs gewonnen werden konnten. Bei einer Implantation in einen chirurgisch induzierten Defekt des Unterkieferknochens der Ratte konnten Streckbein *et al.* (2013) zeigen, dass humane ADSCs, eingebettet in Fibrin, zu einer Osteogenese mit Überbrückung des Knochendefektes im Unterkiefer führten.

2.2.4.2 Endothelzellen

Eine *in vitro* Prävascularisation der Trägermatrizes kann auch durch eine Implantation von Endothelzellen erreicht werden und somit die implantierten vaskulären Strukturen in das Gefäßnetzwerk des Empfängers integrieren (Liu *et al.* 2017a; Zheng *et al.* 2020). Die direkte Implantation von HUVECs als Monokultur oder als Kokultur mit anderen Zellen wie MSCs zeigte bereits eine Steigerung der Konstruktvascularisation *in vivo* (Koob *et al.* 2011). Koob *et al.* (2011) implantierten MSCs isoliert aus dem menschlichen Knochenmark mit HUVECs in einer kommerziell verfügbaren Matrix aus bovinem, spongiösen Knochen (Tutobone®) in einen Defekt des Schädelknochens immundefizienter Mäuse. Nach sechs Wochen konnte eine deutliche Vascularisation der Konstrukte jedoch keine weitere Steigerung der Knochenbildung durch

eine Koimplantation von HUVECs und MSCs im Defekt nachgewiesen werden. Da Matrigel aus dem Engelbreth-Holm-Swarm Maus-Sarkom gewonnen wurde und vielfältige Wachstumsfaktorkomponenten beinhaltet, empfahlen es Koob *et al.* (2011) nicht für eine klinische Anwendung.

Cornejo *et al.* (2012) untersuchten den Einfluss der osteogenen und endothelialen Differenzierung von ADSCs der Lewis-Ratte auf eine Knochenallotransplantation in einen Schädelknochen-defekt der Ratte. Die aus ADSCs differenzierten Endothelzellen und Osteoblasten wurden im Verhältnis von 1:1 implantiert, führten jedoch in der Kokultur zu keinem signifikant erhöhten Einfluss auf die Osteogenese. Eine Vaskularisation des Allotransplantats wurde nach acht Wochen nachgewiesen. Die HUVECs zeigten auch *in vitro*, dass sie eingebettet in eine Kollagen-Fibronectin-Matrix zu einer Bildung humaner, kapillarähnlicher, tubulärer Strukturen führten, welche nach einer *in vivo* Implantation der Matrix in das Gefäßnetzwerk der Maus integriert wurden (Schechner *et al.* 2000).

Bleiziffer *et al.* (2011) implantierten eine Kammer mit murinen embryonalen Endothelial Progenitor Cells (EPCs), eingebettet in Fibrin, s.c. in eine Rückenhauttasche der Ratte. Das Ergebnis zeigte, dass die EPCs im Vergleich zu Fibrin ohne eine Zellimplantation mit einer deutlich gesteigerten Vaskularisation und Bildung von fibrovaskulärem Gewebe

einhergingen. Außerdem konnte eine Migration der EPCs aus dem Fibrin in das neu gebildete Gewebe nachgewiesen werden. Im Vergleich zu HUVECs zeigten EPCs, isoliert aus humanem Blut, *in vivo* jedoch ein deutlich geringeres Potenzial eine Gefäßsprossung zu induzieren (Finkenzeller *et al.* 2009).

Eine Kokultivierung von HUVECs mit humanen MSCs auf einer Ca-Phosphat-Zement-Matrix und anschließender Implantation in einen Schädeldefekt von Nacktratten wurde durch Liu *et al.* (2017a) durchgeführt. Die Nacktratten hatten hierbei eine Mutation des Forkhead-box n1-Gens RH-FOXN1 und waren bereits kongenital ohne Thymus. Die Mutation des FOXN1 Gens führt bei Ratten und Mäusen zur Ausbildung eines nackten, immundefizienten Phänotyps. FOXN1 ist der Hauptregulator der embryonalen Entwicklung des Thymusepithels. Durch den fehlenden Thymus siedeln sich die hämatopoetischen Vorläuferzellen nicht im Gewebe an. Daraus entsteht eine schwere T-Zell-Immundefizienz (Romano *et al.* 2013). Liu *et al.* (2017a) implantierten nach 21 Tagen der *in vitro* Kokultivierung der Zellen in der Matrix, die Konstrukte für 12 Wochen *in vivo*. Es konnte gezeigt werden, dass in den zellhaltigen Konstrukten *in vivo* deutlich mehr Knochengewebe gebildet wurde. Das Knochengewebe war in der Kokultur von HUVECs und MSCs ausgeprägter nachzuweisen als in den jeweiligen Monokulturen. Auch *in vitro* zeigte sich eine

stärkere Vaskularisation der Kokulturgruppe im Gegensatz zu einer Vaskularisation der Konstrukte mit HUVECs als Monokultur. Eine *in vitro* Kokultivierung der HUVECs mit mesenchymalen Stammzellen zeigte eine Hochregulation des knochenspezifischen Enzyms, der AP, was eine Steigerung der osteogenen Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen belegte (Rouwkema *et al.* 2006).

Die Matrixmineralisierung innerhalb der Kokultur von HUVECs und humanen ADSCs wurde nach der Differenzierung in einem osteogenen Medium über die Alizarin Red Färbung nachgewiesen (Mutschall *et al.* 2020). Mutschall *et al.* (2020) konnten zeigen, dass Zellgehalte von jeweils 50 % ADSCs und 50 % HUVECs *in vitro* zu einer signifikanten Steigerung des angiogenen Potenzials und der osteogenen Differenzierung der Zellen führten. Jedoch hat auch das Biomaterial einen Einfluss auf die Wirkungsweisen der ADSCs und HUVECs. Van Hinsbergh *et al.* (2001) konnten zeigen, dass eine Fibrinmatrix selbst einen Einfluss auf die Angiogenese hat und auch die parakrinen Signale zwischen ADSCs und HUVECs beeinflusst wurden.

2.3 Angiogenese

Die Angiogenese findet hauptsächlich im ausgereiften Organismus im Rahmen der Wundheilung und des Tumor- oder

Fettgewebswachstums statt, um die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie den Abtransport von Kohlendioxid und anderen Stoffwechselabbauprodukten zu sichern. Auch die Migration und Rekrutierung von Zellen und Stammzellen werden durch die Kapillarsprossung gesichert (Schmidt *et al.* 2011).

Die Vaskulogenese unterscheidet sich dahingehend, dass sie die Neovaskularisation während der Embryonalentwicklung mit der Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes, durch die Differenzierung von Vorläuferzellen in Endothelzellen, darstellt (Schmidt *et al.* 2011). Die Induktion und Steuerung der Angiogenese erfolgt über eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren wie beispielsweise VEGF und bFGF, parakrine und autokrine Signalmoleküle sowie lokale Einflussfaktoren wie eine Hypoglykämie und Hypoxie. Sie wird in mehrere Abschnitte unterteilt. Nach einer Zunahme der Permeabilität der Gefäßwand kommt es zu einer Freisetzung von Enzymen wie den Serinproteasen und Matrixmetalloproteasen, welche die Basalmembran und die Extrazellulärmatrix abbauen (Schmidt *et al.* 2011). Es kommt zu einer Migration und Chemotaxis der Endothelzellen mit anschließender Proliferation. Es entstehen primäre Endothelröhrchen, welche zu Kapillaren mit ausgebildeten Lumina heranreifen. Durch die Rekrutierung von Muskelzellen und Perizyten entsteht eine stabile Wandstruktur

der neu gebildeten Kapillarsprossen, welche anschließend an das bereits vorhandene Gefäßnetzwerk anastomosieren (McGavin & Zachary, 2009). Bei der Wundheilung können neben den im gesunden Gewebe vorhandenen Endothelzellen auch EPCs aus dem Knochenmark rekrutiert werden, um die Angiogenese im Wundbett zu induzieren. Die Wundheilung beginnt direkt nach der Schädigung des Gewebes. Die Bildung neuen Endothels beginnt ungefähr ab dem vierten Tag und kann bis zu vier Wochen dauern, je nachdem um welche Art der Verletzung es sich handelt und ob Wundheilungsstörungen und eine Verbindung der Wundränder bestehen (McGavin & Zachary, 2009).

Abbildung 4 stellt die einzelnen Schritte der Angiogenese dar (aus: McGavin & Zachary, 2009).

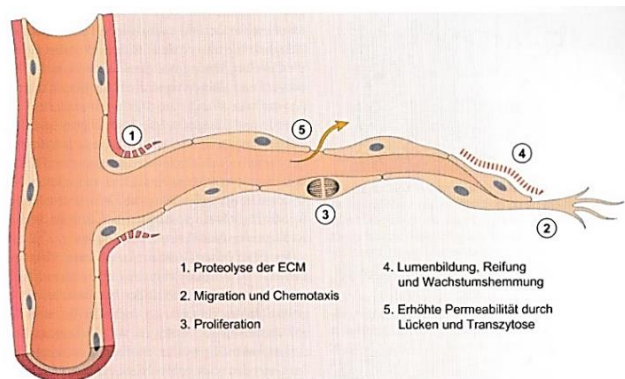


Abb. 4.30 Schritte der Angiogenese. ECM: extrazelluläre Matrix. (Modifiziert nach Motamed K, Sage EH: *Kidney Int* 51:1383, 1997.)

Abbildung 4: Angiogenese.

(Aus: McGavin & Zachary, 2009)

2.3.1 Chirurgisch induzierte Angiogenese

Der Erhalt der Zellvitalität über eine Nährstoff- und Sauerstoffversorgung per Diffusion ist nur über die kurze Distanz von 150 – 200 μm über die Zellmembran möglich (Folkman & Hochberg, 1973). Ein ausgebildetes Gefäßnetzwerk hat die Funktion die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sicherzustellen, Stoffwechselprodukte abzutransportieren (McGavin & Zachary, 2009) und ist oft ein limitierender Faktor für das Zellüberleben in größeren Konstrukten (Arkudas *et al.* 2010). Auch das Zusammenspiel zwischen der Knochenneubildung und der Angiogenese ist eine bedeutende Voraussetzung für die Neubildung von Knochengewebe insbesondere in den frühen Stadien der Osteogenese (Hausman *et al.* 2001).

Hausmann *et al.* (2001) konnten bei einer chirurgisch herbeigeführten, geschlossenen Femurfraktur der Ratte zeigen, dass durch Verabreichung des Angiogenese-Inhibitors TNP-470 eine vollständige Frakturheilung unterbunden wurde. Zur Steigerung der Angiogenese wurden Studien wie die Implantation von Wachstumsfaktoren wie dem VEGF (Sahni & Francis, 2000), die chirurgisch induzierte Angiogenese über verschiedene Angiogenesemodelle (Tanaka *et al.* 2003) oder eine Implantation von Endothelzellen (Koob *et al.* 2011) und die Verwendung von prävascularisierten Konstrukten (Liu *et al.*

2017a) durchgeführt. Eine *in vitro* Prävaskularisation der Trägermatrizes durch Endothelzellen wurde mit dem Ziel generiert die implantierten vaskulären Strukturen in das Gefäßnetzwerk des Empfängers zu integrieren (Liu *et al.* 2017a; Zheng *et al.* 2020).

Zheng *et al.* (2020) entfernten den mittleren Knochenteil des Radius im Tiermodell an Hunden und prävaskularisierten ihn in einer Versuchsgruppe durch eine subkutane Implantation des Knochenfragments nahe der *V. saphena*. Der Knochenteil in einer Kontrollgruppe wurde bei einer Temperatur von -80°C kryokonserviert. Nach acht Wochen wurden die Knochenfragmente gruppenspezifisch in die Mitte des Radius retransplantiert. Der Radius wurde vor der Entnahme des jeweiligen Knochenfragmentes mit einer angepassten Titanplatte fixiert. Es zeigte sich eine deutlich schnellere Heilung der prävaskularisierten Knochenfragmente entlang der Frakturlinien am mittleren Radius, im Gegensatz zur nicht prävaskularisierten, kryopräparierten Kontrollgruppe (Zheng *et al.* 2020).

Willems *et al.* (2014) konnten im Defektmodell des Femurs bei der Ratte zeigen, dass aus dem Femur entnommene, kryokonservierte Knochenfragmente nach einer Retransplantation ohne Revaskularisation zu einer schlechteren Knochenbildungsrate führten, als die mit einem AV-Bundle der

A. und V. *saphena* revaskularisierten Knochenfragmente. Die Revaskularisation erfolgte hierbei erst nach der Replantation durch das Legen des AV-Bundles durch die Markhöhle des Knochenfragments. Studien belegten auch, dass durch eine chirurgisch induzierte Angiogenese sowohl die Neubildung von Knochengewebe als auch die Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes deutlich gesteigert wurde (Weigand *et al.* 2016a; Weigand *et al.* 2015). Polykandriotis *et al.* (2008) implantieren eine Fibrinmatrix in einer Teflonkammer in das AV-Loop-Modell der Ratte und konnte eine beginnende Neoangiogenese innerhalb der Matrix nach 10 – 14 Tagen nachweisen.

2.3.1.1 Das AV-Loop-Modell

Das AV-Loop-Modell als Angiogenesemodell wurde erstmals 1979 durch Erol und Spira bei der Transplantation eines Hautlappens im Tierversuchsmodell beschrieben. Die mikrochirurgische Anastomose einer Vene mit einer Arterie zu einer Gefäßschleife zeigte, dass der AV-Loop zur Bildung eines neuen Gefäßnetzwerkes führte und somit eine Nekrose des transplantierten Hautlappens verhinderte (Erol und Spira, 1979). Auch eine Implantation von Osteoblasten in das AV-Loop-Modell konnte das Zellüberleben im Gegensatz zu einer Matrix ohne AV-Loop deutlich steigern (Steiner *et al.* 2018).

zitiert nach Arkudas *et al.* 2007a). Die Bildung des Gefäßnetzwerkes ausgehend vom AV-Loop findet unter anderem durch eine traumatische Schädigung der Gefäßwand sowie einer Hypoxie in der Kammer statt. Blutungen und Entzündungsprozesse führen zu einer Förderung der Angiogenese. Zudem sind mechanische Faktoren wie die Spannung der Gefäßwand an der Gefäßsprossung beteiligt (Polykandriotis *et al.* 2008; Tanaka *et al.* 2003).

Im Knochen Tissue Engineering gewann das AV-Loop-Modell sowohl im Großtiermodell beim Schaf (Boos *et al.* 2013), als auch im Kleintiermodell bei der Ratte (Arkudas *et al.* 2007b) immer mehr an Bedeutung. Bei der Ratte wird die Anastomose im AV-Loop-Modell an der medialen Hintergliedmaße mit den Femoralgefäßen oder als Modifikation mit der *V. saphena* oder *V. epigastrica* durchgeführt (Weigand *et al.* 2016a). Für das Rattenmodell wurden unter anderem Lewis-Ratten verwendet (Arkudas *et al.* 2007a).

Die Lewis-Ratte wurde in den 1950er Jahren durch M. Lewis aus einer Zucht der Wistar-Ratten entwickelt. Sie zeichnen sich durch ihr freundliches Wesen aus und gehört zu den gängigen Laborratten (Modlinska & Pisula 2020). Für die Implantation von Biomaterialien kann ebenfalls eine Linie immundefizienter Nacktratten verwendet werden (Liu *et al.* 2017a). Brooks *et al.* (1980) konnten bei dieser Linie der Nacktratten feststellen, dass

Teile der Milz und der Lymphknoten lymphotozytenarm waren. Der Thymus war kongenital aplastisch. In der Immunfluoreszenz mit einem anti-T-Zell-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Rowett Nude (RNU)-Ratten keine funktionalen T-Zellen besaßen (Brooks *et al.* 1980).

Festing *et al.* (1978) beschrieben hierfür die RNU-Ratte, als haarlose, athymische Zucht. T-Zellen induzieren eine akute Abstoßungsreaktion bei der Transplantation von Organen zweier genetisch unterschiedlicher Individuen (Souza-Offtermatt *et al.* 2004). Bei der Implantation von MSCs, HUVECs und Tutobone® durch Koob *et al.* (2011) wurden immundefiziente Mäuse verwendet. Diese Mäuse wiesen eine Mutation im Genom auf und wurden daher für eine Transplantation körperfremden Gewebes (Xenotransplantation) aufgrund fehlerhafter T- und B-Zellfunktionen verwendet. Diese Fehlfunktionen führten zu einer verminderten Immunreaktion auf implantiertes, körperfremdes Gewebe, jedoch wurde keine negative Beeinträchtigung der Knochenneubildung festgestellt (Koob *et al.* 2011).

Ein Vorteil des AV-Loop-Modells ist, dass die Ligatur der Gefäße nicht in einer Minderperfusion der Hintergliedmaßen resultierte (Polykandriotis *et al.* 2007). Die genaue Durchführung einer AV-Loop-Operation beschrieben Weigand *et al.* (2016a) anhand eines Protokolls. Für die Durchführung

der AV-Loop-Operation wurde ein mikrochirurgisches Mikroskop sowie ein Nahtmaterial mit einer Fadenstärke von United States Pharmacopeia (USP) 11-0 verwendet (Weigand *et al.* 2016a). Die klinische Anwendung samt der Implantation von Biomaterialien wie Fibrin und HA fand bereits im Rahmen eines individuellen Heilversuches beim Menschen statt (Horch *et al.* 2014).

Das AV-Bundle stellt ein weiteres Angiogenesemodell dar. Hierbei kann zwischen zwei Modellen unterschieden werden. Zum einen das Ligaturmodell, bei welchem die Gefäße distal ligiert werden und zum anderen ein Durchflussmodell, bei dem ausschließlich eine Ligatur der Seitenäste erfolgt und somit der Blutfluss erhalten bleibt (Tanaka *et al.* 2003). Das zu implantierende Konstrukt wird im AV-Bundle direkt um die Gefäße geschichtet oder als Zylinder außen herum platziert. Anastomosen der A.- und V. *epigastrica superficialis*, der A.- und V. *saphena* oder der A.- und V. *femoralis* wurden unter anderem in diesem Modell beschrieben (Ismail *et al.* 2017; Pelzer *et al.* 2007; Tanaka *et al.* 2003). Im direkten Vergleich des AV-Loop- und AV-Bundle-Modells ist das AV-Loop-Modell aufgrund signifikant erhöhter Gewebeneubildung, einem deutlich gesteigerten Blutfluss sowie effizienter Gefäßneubildung von Vorteil (Tanaka *et al.* 2003).

Pelzer *et al.* (2007) legten in einer Studie das ligierte

Gefäßbündel der A.- und V. *saphena* einer Ratte durch ein Knochentransplantat des Femurs einer Spenderratte. Das zum Knochentransplantat zugehörige Gefäßbündel der A.- und V. *iliaca* wurde mit den Femoralgefäßen der Empfängerratte anastomosiert. Die Ratten erhielten im Vergleich Immunsuppressiva und keine Immunsuppressiva. Nach einer Implantationszeit von 18 Wochen wurden die Neoangiogenese und der Blutfluss ausgewertet, welche in der immunsupprimierten Gruppe besser abschnitten. Auch die Raten der Thrombosierung des AV-Bundles waren in der immunsupprimierten Gruppe niedriger (Pelzer *et al.* 2007). Eine Thrombose⁵ hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine Endothelläsion, eine Strömungsverlangsamung des Blutflusses, eine Infektion, eine Immunreaktion oder eine Hypovolämie können unter anderem zu einer Thrombose führen. Auch kann eine Gefäßwandquetschung eine Thrombose induzieren (McGavin & Zachary, 2009).

Weigand *et al.* (2016a) beschrieben im Operationsprotokoll des AV-Loop-Modells bei der Ratte, dass aufgrund der mehrstündigen Operation eine adäquate Flüssigkeitsversorgung sicherzustellen ist. Außerdem besteht das Risiko einer Thrombose aufgrund der Größe der Gefäße. Jedoch konnte laut

⁵ Bildung eines Blutgerinnsels aus Fibrin, Thrombozyten und weiteren Blutbestandteilen im Gefäßlumen (McGavin & Zachary, 2009)

Weigand *et al.* (2016a) in AV-Loop-Studien seit 2007 am Rattenmodell eine Durchgängigkeitsrate der AV-Loops von 80 - 100 % erreicht werden. Hierbei wurden postoperativ kurzzeitige Heparin-Gaben zur Antikoagulation beschrieben (Weigand *et al.* 2016a). Arkudas *et al.* (2009b) verabreichten den Ratten nach der AV-Loop-Operation für ein bis zwei Tage Heparin und erreichten eine Durchgängigkeitsrate von 90 %. Weigand *et al.* (2015) verabreichten den Schafen nach der AV-Loop-Operation Sodium Enoxaparin (Clexane Multidose®) und Clopidogrel (Plavix®) zweimal täglich (Zeitraum unbenannt) und erreichten eine Durchgängigkeitsrate von 100 %. Steiner *et al.* (2018) verabreichten den Ratten im AV-Loop-Modell zwei Tage postoperativ Enoxaparin und die Rate durchgängiger AV-Loops lag bei 71 % in einer Gruppe mit ADA-GEL Kapseln und MSCs und bei 62,5 % in einer Gruppe mit ausschließlich ADA-GEL Kapseln.

Polykandriotis *et al.* (2011) werteten in einer retrospektiven Studie die Erfolgsrate von 612 AV-Loop-Operationen an Lewis-Ratten aus. Dabei stellte sich heraus, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Operationsdauer und dem Operationserfolg in Form der Anzahl an AV-Loop-Thrombosen und den Erfahrungswerten, der Übung des Operateurs und den individuellen mikrochirurgischen Fähigkeiten gab. Weniger der Zeitpunkt der Explantation oder

die implantierte Matrix waren am Operationserfolg beteiligt. Die Fähigkeiten, Erfahrungen und die Übung des Operators waren die wichtigsten Voraussetzungen für eine erfolgreiche AV-Loop-Operation. Betont wurde von Polykandriotis *et al.* (2011) ebenfalls, dass das AV-Loop-Modell aufgrund seiner Komplexität für Screening-Zwecke weniger geeignet ist.

2.4 *Analyse der Konstruktivaskularisation und Knochenneubildung*

Um die Vaskularisation und Osteogenese der implantierten Biomaterialien nach der Explantation beurteilen zu können, gibt es eine Vielzahl von Analysemethoden. Neben der histologischen Auswertung (Arkudas *et al.* 2009b) und der Immunfluoreszenz (Steiner *et al.* 2018) ist auch eine 3D-Darstellung durch die μ -Computertomographie (μ CT) möglich (Ghanavati *et al.* 2014).

2.4.1 *3D-Quantifizierung der Vaskularisation*

Um die Gefäßstrukturen innerhalb der implantierten Trägermaterialien darzustellen und zu quantifizieren besteht die Möglichkeit das Gefäßsystem mit einer Perfusionslösung zu spülen.

Bei der Perfusion erfolgte eine Spülung des Gefäßsystems durch eine Ringer-Heparin-Lösung (100 I.U. /ml) über einen

Venenverweilkatheter in der Aorta. Ein Blutentzug wurde durch eine Durchtrennung der *V. cava* erreicht. Über den Venenverweilkatheter wird anschließend das Gefäßsystem der Ratte mittels einer Perfusionslösung wie dem Microfil® (Flow Tech, Inc., Carver) in einer Menge von 20 ml gespült und unter Beimengung eines Härters von 0,6 ml ausgehärtet (Steiner *et al.* 2018). Um das Gefäßnetzwerk vor der Verwendung eines Kontrastmittels für eine *ex vivo* Darstellung zu fixieren, kann eine intravaskuläre Perfusion mit 4 %iger Paraformaldehyd (PFA)-Fixationslösung erfolgen (Schürmann *et al.* 2015). Vor einer μ CT-Darstellung wurde durch Buehrer *et al.* (2015) eine Dekalzifizierung der explantierten Konstrukte durchgeführt. Buehrer *et al.* (2015) dekalzifizierten HA-/ β -TCP-, Fibrin- und MSC- Konstrukte in einer Titankammer nach einer AV-Loop-Implantation und Perfusion mit Microfil® für drei Wochen bei 4 °C in Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und fertigten anschließend erfolgreich μ CT-Aufnahmen an.

Arkudas *et al.* (2012) dekalzifizierten Konstrukte aus HA/ β -TCP und Fibrin, welche im AV-Loop-Modell der Ratte implantiert und mit Microfil® perfundiert wurden, ebenfalls für drei Wochen und fertigten anschließend erfolgreich μ CT-Aufnahmen an. Im gleichen Modell mit einer Matrix aus 45S5 Bioglass® und Fibrin erfolgte auch eine Microfil® Perfusion mit einer dreiwöchigen Dekalzifizierung der Konstrukte in EDTA.

Anschließend wurden erfolgreich μ CT-Aufnahmen angefertigt (Arkudas *et al.* 2013). Das Microfil® ist eine bleihaltige Silikonlösung, welche unter Zugabe eines Härters unter geringer Schrumpfung im Gefäßsystem aushärtet (Cortell, 1969) und anschließend im *ex vivo* μ CT röntgenundurchlässig dargestellt wird (Ghanavati *et al.* 2014). Hierbei wurde eine Perfusionsrate von ca. 90 % erreicht (Ghanavati *et al.* 2014).

Im AV-Loop-Modell wurde es bereits mehrfach zu einer Darstellung der Gefäßstrukturen sowohl bei der Ratte (Polykandriotis *et al.* 2007) als auch beim Schaf verwendet (Weigand *et al.* 2015). Hierbei stellte sich auch heraus, dass eine 3D-Quantifizierung der gesamten Gefäßlängen durch eine μ CT-Darstellung einer ausschließlich histologischen Analyse vorzuziehen ist, da die Histologie nur Teilschnitte des gesamten Konstruktes mit einbezieht (Arkudas *et al.* 2010).

Das μ CT ist ein bildgebendes Verfahren welches röntgenologisch hochauflösende 3D-Bilder des mit einem Kontrastmittel perfundierten Gefäßnetzwerkes *ex vivo* ermöglicht (Schürmann *et al.* 2015). Auch ein *in vivo* μ CT ist möglich. Huehnerschulte *et al.* (2011) untersuchten die Korrosion und *in vivo* Degeneration der Magnesiumlegierungen ZEK100 und AX30 nach einer Implantation in Knochendefekte der Tibia von Kaninchen. Durch die μ CT-Scans war es hierbei erstmals möglich die Abbaukinetik der Magnesiumlegierungen

in vivo zu verschiedenen Zeitpunkten auszuwerten, ohne die Notwendigkeit einer vorangegangene Explantation.

Ehling *et al.* (2014) beschrieben die μ CT-Darstellung vier verschiedener Tumormodelle an Mäusen. Durch eine Injektion eines eigens hergestellten Jod-haltigen Kontrastmittels war eine intravitale μ CT-Analyse der Tumorangiogenese möglich. Das dreidimensionale Gefäßnetzwerk wurde auch im *ex vivo* μ CT dargestellt.

Ehling *et al.* (2014) zählten die Vorteile der Bildgebungsverfahren auf. Diese waren eine Benutzerunabhängigkeit, einfache Anwendung, hohe Auflösung sowie eine Charakterisierung von Mikrogefäßen der Tumoren. Als nachteilig wurden die Notwendigkeit eines Kontrastmittels, die geringe Kontrastmittelsensitivität des CTs sowie die Exposition mit der Röntgenstrahlung genannt. Insgesamt wurde das μ CT jedoch als einfache und schnelle Methodik gewertet, um eine hochauflösende und detailgenaue Charakterisierung der Tumorangiogenese zu ermöglichen (Ehling *et al.* 2014).

Das Microfil[®] ist eine Perfusionslösung, welche in den histologischen Schnittbildern nach der Fixation im Gefäßlumen als schwarze Bereiche sichtbar bleiben (Steiner *et al.* 2018). Die India Ink Lösung wird aus 50 % India Ink (Rohrer & Klinger), 5 % Gelatine und 4 % Mannitol angesetzt und färbt die Intima der Gefäße schwarz, was in den histologischen Schnittbildern

die Gefäßdetektion erleichtert (Schmidt *et al.* 2013).

Eine weitere Möglichkeit ist die Perfusion mit μ Angiofil[®] (Fumedica AG, Muri, AG, Switzerland), ein polymerisierendes Kontrastmittel (Schaad *et al.* 2017). Im Gegensatz zum Microfil[®] ermöglicht das μ Angiofil[®] eine Darstellung des Gefäßnetzwerks auf Kapillarebene, mit einer höheren Perfusionskontinuität (Hlushchuk *et al.* 2018; Schaad *et al.* 2017).

Die Problematik herkömmlicher Kontrastmittel wie beispielsweise Osmiumtetroxid (Johnson *et al.* 2006) liegt in der hohen Toxizität für den Anwender. Kritische Punkte sind auch ein Schrumpfen der Perfusionslösung innerhalb der Gefäße sowie eine Verklumpung und damit Obstruktion kleinerer Gefäße (Krucker *et al.* 2006; Schaad *et al.* 2017). Auch beschreiben Weigand *et al.* (2015) nach der Implantation einer Titan- und Teflonkammer im AV-Loop-Modell des Schafes, dass die Art der Kammer in Zusammenhang mit einer erfolgreichen Perfusion mit Microfil[®] steht. Bei der Implantation der Titankammer kam es zu einer ungleichen Verteilung der Perfusionslösung. Dies wurde auf die Verknüpfung der intrinsischen Gefäße mit den um die Titankammer befindlichen Gefäßen zurückgeführt, da sich das Kontrastmittels hauptsächlich in den umliegenden Gefäßen sammelte. In der Teflonkammer akkumulierte das Microfil[®] in

den inneren Gefäßen, was zu einer besseren μ CT Darstellung führte (Weigand *et al.* 2015).

Eine automatisierte Quantifizierung der Vaskularisation über histologische Schnittbilder konnte bereits mit einem durch Weis *et al.* (2015) entwickelten Algorithmus erfolgen. Hierfür wurde der Algorithmus mit dem Computerprogramm Matrix Laboratory (MATLAB) generiert. Er basierte auf dem Erkennen der farblichen Unterschiede zwischen dem schwarzen Microfil® im Gefäßlumen in „positive Ereignisse“ und den umliegenden Endothelzellen der Gefäße in „negative Ereignisse“, im histologischen Schnittbild. Das Programm bestimmt anschließend Parameter wie die Gefäßanzahl sowie den Gefäßdurchmesser und die Gefäßverteilung im histologischen Schnittbild. Das Programm führte zu einer kostengünstigen und Betrachter-unabhängigen Auswertung, welche außerdem eine deutliche Zeitersparnis erbrachte. Jedoch ist eine vollständige Füllung der Gefäße mit der Perfusionslösung notwendig, da ansonsten eine manuelle Füllung des Gefäßlumens im histologischen Schnittbild per Bildbearbeitung notwendig ist (Weis *et al.* 2015).

2.4.2 Histologische Quantifizierung

Bei der histologischen Darstellung von Knochengewebe ist für den Paraffinschnitt mithilfe des Mikrotoms eine vorhergehende

Dekalzifizierung notwendig, welche beispielsweise mit einer EDTA-Lösung in einem Ultraschallbad erfolgen kann (Weigand *et al.* 2015).

Ein mögliches Protokoll beschreiben Liu *et al.* (2017b) anhand von Knochenpräparaten des Femurs von Ratten. Nach der Fixierung der Präparate in 4 %igem Formaldehyd für 24 Stunden erfolgte eine Dekalzifizierung mit anschließender Dehydrierung und Einbettung in Paraffin. Die eingebetteten Präparate wurden danach durch die Verwendung eines Microtoms in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Aufgezogen wurden sie auf einen Glasobjektträger mit anschließender histologischer Färbung (Liu *et al.* 2017b). Auch die Darstellung von Knochengewebe ohne eine vorherige Dekalzifizierung ist möglich. Ein Vorteil dieser Methodik ist die Darstellung der mineralisierten Komponenten des Knochengewebes, welche bei einer vorherigen Dekalzifizierung nicht dargestellt werden (Goldschlager *et al.* 2010). Jedoch sollte die Probe ein bis zwei Wochen in Formaldehyd und anschließend insgesamt fünf Wochen in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus Ethanol und Butanol lagern (Goldschlager *et al.* 2010).

Goldschlager *et al.* (2010) protokollierten die allgemeine Einbettung und Färbung von Knochenpräparaten in Technovit 7100, 3040 und 9100. Technovit ist ein Harz auf Methacrylatbasis mit ähnlicher Dichte und Härte wie

Knochengewebe, welches als Einbettungsmedium fungierte. Mittels eines Makrotoms mit Diamantblatt erfolgte ein Schleifen der Schliffbilder nach der Einbettung. Durch ein Schlittenmikrotom oder ein angetriebenes Rotationsmikrotom konnten auch dünnere Schnitte für eine lichtmikroskopische Darstellung hergestellt werden, da das Schleifen nur dickere Schliffbilder von 20-50 μm erzeugte (Goldschlager *et al.* 2010). Der Unterschied zu einer Einbettung in Paraffin lag darin, dass eine Einbettung in Technovit irreversibel war (Goldschlager *et al.* 2010).

Eine mögliche histologische Färbung ist beispielweise die von Kossa Färbung, bei welcher eine Silbernitrat-Lösung an die Anionen der Ca-Salze des Knochengewebes bindet und diese schwarz färbt (Wang *et al.* 2006). Koob *et al.* (2011) verwendeten eine Einbettung der Konstrukte aus Tutobone®, HUVECs, MSCs, Fibrin oder Matrigel in Technovit 9100 und führten anschließend zum Nachweis des mineralisierten Knochengewebes eine von Kossa Färbung durch. Die mineralisierten Bereiche waren im histologischen Schnittbild schwarz dargestellt.

Ein histologisches Standardverfahren ist die Hämatoxylin-Eosin-(HE) Färbung (Weyrauch *et al.* 2009). Hämatoxylin ist basisch, entwickelt sich erst während der Färbung durch Oxidation und reagiert mit den sauren Zellbestandteilen, wie

zum Beispiel den Nukleinsäuren des Zellkernes. Mit der Interzellulärsubstanz und den basischen Zellbestandteilen reagiert der saure Farbstoff Eosin (Weyrauch *et al.* 2009). Die Zellkerne werden in der HE-Färbung blau, das Zytoplasma blassrot, elastische Fasern rosa, Kollagenfasern rot und Knochen rot dargestellt (Sinowatz & Rodler, 2019).

Die Trichromfärbung nach Masson-Goldner ist eine Färbung bei welcher das fibrovaskuläre Gewebe, Muskel- und Kollagenfasern sowie Knochengewebe dargestellt werden können. Es dient als Trichromfärbung der Unterscheidung von den Geweben, welche in der HE-Färbung mit dem sauren Farbstoff Eosin angefärbt werden. Durch Eisenhämatoxylin werden die Zellkerne schwarz-braun gefärbt, das Zytoplasma färbt sich durch den Farbstoff Säurefuchsin-Ponceau rot und die Kollagenfasern werden lichtgrün-türkis dargestellt (Sinowatz & Rodler, 2019). Die Knochenmatrix wird ebenfalls lichtgrün dargestellt (Lang, 2012). Zur Darstellung von Makrophagen kann eine Färbung mit dem Antikörper ED1 erfolgen, welcher an Makrophagen bindet. Diese werden im histologischen Schnittbild rot dargestellt (Steiner *et al.* 2018).

Bei der Immunhistochemie wurden die histologischen Schnitte eines Femurs der Ratte durch Liu *et al.* (2017b) in den Dekalzifizierungslösungen 8 % Salzsäure/Ameisensäure, 10 % EDTA und 3 % sowie 5 % Salpetersäure inkubiert. Dargestellt

werden sollte das Knochenantigen des Wachstumsfaktors Insulin-like growth factor 1. Nach der Dekalzifizierung wurden die Schnitte mit einem für den Insulin-like-growth factor 1 positiven, primären Antikörper und einem zugehörigen sekundären Antikörper inkubiert, mit Hämatoxylin und 3,3'-Diaminobenzidin gefärbt und histologisch ausgewertet. Ein wichtiger Punkt für eine Immunhistochemie war, dass bei einer Dekalzifizierung der Gewebeproben die Antigenität des Gewebes erhalten bleibt (Liu *et al.* 2017b).

Liu *et al.* (2017b) verglichen die Lösungen und fanden heraus, dass die Antigenität des Knochengewebes in der 10 %igen EDTA-Lösung und der 5 %igen Salpetersäure am besten erhalten blieb. Für die Darstellung von neu entstandenen Gefäßstrukturen im histologischen Schnitt konnte eine alpha-Smooth-Muscle-Actin Färbung genutzt werden. Die Färbung stellt die glatten Muskelzellen in der Gefäßwand dar (Steiner *et al.* 2018). Hierbei wurden die Schnitte deparaffiniert, mit einem primären anti-alpha-Smooth-Muscle-Actin Antikörper und anschließend mit einem zweiten Antikörper gekoppelt (Arkudas *et al.* 2009a).

Gefäßähnliche Strukturen konnten auch nach einer *in vitro* Kultivierung von HUVECs mit MSCs auf einer Ca-Phosphat-Zement-Matrix durch Liu *et al.* (2017a) nachgewiesen werden. Hierfür wurden die HUVECs mit einem anti-humanen CD31

Antikörper nach 21 Tagen gefärbt und anschließend mit dem fluoreszierenden, sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 inkubiert. In der Immunfluoreszenz konnten gefäßähnliche Strukturen in der Kokultur sowie die HUVECs als Kontrollgruppe in der Monokultur nach 21 Tagen nachgewiesen werden (Liu *et al.* 2017a).

Eine Immunfluoreszenz von ADSCs aus dem Fettgewebe von Mäusen wurde auch durch Yamamoto *et al.* (2007) durchgeführt. Hierbei wurden unter anderem allgemeine Stammzellmarker wie CD90 und CD105 verwendet, welche die ADSCs erfolgreich anfärbten.

3 Publikationen

3.1 Publikation 1

► Tissue Eng Part A. 2021 Mar;27(5-6):413-423. doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0087. Epub 2020 Sep 18.

Human Umbilical Vein Endothelial Cell Support Bone Formation of Adipose-Derived Stem Cell-Loaded and 3D-Printed Osteogenic Matrices in the Arteriovenous Loop Model

Sophie Winkler^{1 2 3}, Hilkea Mutschall^{1 2}, Jonas Biggemann⁴, Tobias Fey^{4 5}, Peter Greil⁴, Carolin Körner⁶, Volker Weisbach⁷, Andrea Meyer-Lindenberg³, Andreas Arkudas^{1 2}, Raymund E Horch^{1 2}, Dominik Steiner^{1 2}

Affiliations – collapse

Affiliations

- 1 Department of Plastic and Hand Surgery, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.
- 2 Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Department of Plastic and Hand Surgery, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.
- 3 Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University Munich, München, Germany.
- 4 Department of Materials Science and Engineering, Institute of Glass and Ceramics, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.
- 5 Frontier Research Institute for Materials Science, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.
- 6 Department of Materials Science and Engineering, Institute of Science and Technology of Metals, Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.
- 7 Department of Transfusion Medicine and Hemostaseology, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

Abstract

Introduction: For the regeneration of large volume tissue defects, the interaction between angiogenesis and osteogenesis is a crucial prerequisite. The surgically induced angiogenesis by means of an arteriovenous loop (AVL), is a powerful methodology to enhance vascularization of osteogenic matrices. Moreover, the AVL increases oxygen and nutrition supply, thereby supporting cell survival as well as tissue formation. Adipose-derived stem cells (ADSCs) are interesting cell sources because of their simple isolation, expansion, and their osteogenic potential. This study targets to investigate the coimplantation of human ADSCs after osteogenic differentiation and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), embedded in a vascularized osteogenic matrix of hydroxyapatite (HAp) ceramic for bone tissue engineering. **Materials and Methods:** An osteogenic matrix consisting of HAp granules and fibrin has been vascularized by means of an AVL. Trials in experimental groups of four settings were performed. Control experiments without any cells (A) and three cell-loaded groups using HUVECs (B), ADSCs (C), as well as the combination of ADSCs and HUVECs (D) were performed. The scaffolds were implanted in a porous titanium chamber, fixed subcutaneously in the hind leg of immunodeficient Rowett Nude rats and explanted after 6 weeks. **Results:** In all groups, the osteogenic matrix was strongly vascularized. Moreover, remodeling processes and bone formation in the cell-containing groups with more bone in the coimplantation group were proved successful. **Conclusion:** Vascularization and bone formation of osteogenic matrices consisting of ADSCs and HUVECs in the rat AVL model could be demonstrated successfully for the first time. Hence, the coimplantation of differentiated ADSCs with HUVECs may therefore be considered as a promising approach for bone tissue engineering.

Keywords: ADSC; AVL model; HUVEC; angiogenesis; bone tissue engineering; osteogenesis.

TISSUE ENGINEERING: Part A
Volume 27, Numbers 5 and 6, 2021
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tea.2020.0087



ORIGINAL ARTICLE

Human Umbilical Vein Endothelial Cell Support Bone Formation of Adipose-Derived Stem Cell-Loaded and 3D-Printed Osteogenic Matrices in the Arteriovenous Loop Model

Sophie Winkler, VMD,¹⁻³ Hilkea Mutschall, MD,^{1,2} Jonas Biggemann, MS,⁴ Tobias Fey, PhD,^{4,5} Peter Greil, PhD,⁴ Carolin Körner, PhD,⁵ Volker Weisbach, MD,⁷ Andrea Meyer-Lindenberg, VMD,³ Andreas Arkudas, MD,^{1,2} Raymund E. Horch, MD,^{1,2} and Dominik Steiner, MD^{1,2}

Introduction: For the regeneration of large volume tissue defects, the interaction between angiogenesis and osteogenesis is a crucial prerequisite. The surgically induced angiogenesis by means of an arteriovenous loop (AVL), is a powerful methodology to enhance vascularization of osteogenic matrices. Moreover, the AVL increases oxygen and nutrition supply, thereby supporting cell survival as well as tissue formation. Adipose-derived stem cells (ADSCs) are interesting cell sources because of their simple isolation, expansion, and their osteogenic potential. This study targets to investigate the coimplantation of human ADSCs after osteogenic differentiation and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), embedded in a vascularized osteogenic matrix of hydroxyapatite (HAp) ceramic for bone tissue engineering.

Materials and Methods: An osteogenic matrix consisting of HAp granules and fibrin has been vascularized by means of an AVL. Trials in experimental groups of four settings were performed. Control experiments without any cells (A) and three cell-loaded groups using HUVECs (B), ADSCs (C), as well as the combination of ADSCs and HUVECs (D) were performed. The scaffolds were implanted in a porous titanium chamber, fixed subcutaneously in the hind leg of immunodeficient Rowett Nude rats and explanted after 6 weeks.

Results: In all groups, the osteogenic matrix was strongly vascularized. Moreover, remodeling processes and bone formation in the cell-containing groups with more bone in the coimplantation group were proved successful.

Conclusion: Vascularization and bone formation of osteogenic matrices consisting of ADSCs and HUVECs in the rat AVL model could be demonstrated successfully for the first time. Hence, the coimplantation of differentiated ADSCs with HUVECs may therefore be considered as a promising approach for bone tissue engineering.

Keywords: bone tissue engineering, AVL model, ADSC, HUVEC, osteogenesis, angiogenesis

¹Department of Plastic and Hand Surgery, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

²Laboratory for Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Department of Plastic and Hand Surgery, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

³Clinic for Small Animal Surgery and Reproduction, Ludwig-Maximilians-University Munich, München, Germany.

⁴Department of Materials Science and Engineering, Institute of Glass and Ceramics, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

⁵Frontier Research Institute for Materials Science, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.

⁶Department of Materials Science and Engineering, Institute of Science and Technology of Metals, Friedrich-Alexander-University of Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

⁷Department of Transfusion Medicine and Hemostaseology, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

Parts of this work have been presented within the 11th European Plastic Surgery Research Council (EPSRC), August 2019, Munich, Germany; at the symposium of the Interdisciplinary Center for Clinical Research (IZKF), June 2019, Kloster Banz, Germany and at the annual conference of the German-speaking Working Group for Microsurgery of Peripheral Nerves and Vessels (DAM), November 2019, Munich, Germany.

Impact Statement

Due to their low donor-site morbidity, osteogenic potential and their good cell expansion, human adipose-derived stem cell is an interesting cell source. The goal of this study is to transfer the *in vitro* results of increasing osteogenic potential upon cocultivation with human umbilical vein endothelial cell, to the rat arteriovenous loop model within the next step. Without using growth factors, the biomaterials, fibrin and HAp, which have already been successfully applied in clinical practice, are supposed to support bone formation by the implanted cells. The results demonstrated that vascularized bone tissue was formed in the cell-containing groups after 6 weeks.

Introduction

EXTENSIVE BONE TISSUE DEFECTS, caused by neoplasm, trauma, infection, or surgical resection, represent a challenge in therapy due to the structural bone integrity and vascularization to regain function.^{1,2} Today, autologous cancellous bone or vascularized bone grafts, which may be associated with a higher donor-site morbidity, represent the gold standard for bone reconstruction. In this regard, biomaterials with osteogenic properties may be used to reconstruct large-volume bone defects.²⁻⁵ Fibrin is a hydrogel which is often successfully applied in tissue engineering applications and showcases many properties of capable biomaterials.^{3,4,6} Besides a good biocompatibility and biodegradation, fibrin provides the cells with a comparative milieu as the extracellular matrix.^{7,8} These, and other properties make up excellent conditions for a balance between biodegradation and tissue regeneration.

In addition to fibrin, we used granular hydroxyapatite (HAp) to generate an osteogenic scaffold. HAp is the main component of the inorganic substance in bones and teeth. Natural or synthetically produced HAp has already been widely used for bone and dental defect reconstructions. The granular form, porosity, and mechanical strength of the material stabilizes the scaffold, facilitates construct vascularization, and supports cell migration.⁹⁻¹¹ Not only the characteristics of the biomaterial but also the nutrient and oxygen supply are essential for cell survival and bone formation of the scaffold. In this regard, the most challenging part in the fields of bone tissue engineering is to sufficiently vascularize the cell-loaded osteogenic scaffolds. Extrinsic vascularization from the surrounding tissue will lead to hypoxic cell death of the centrally located osteogenic cells in bone tissue engineering constructs due to a limited diffusion range of 200 μm .

A promising strategy is the surgically induced angiogenesis or so-called prefabrication. More than four decades ago, Erol and Sira described the microsurgical interposition of a vein graft between the saphenous vein and artery creating an arteriovenous loop (AVL).¹² The AVL enables intrinsic vascularization of manifold biomaterials such as spider silk,⁵ alginate dialdehyde crosslinked with gelatin¹³ or 45S5 bioactive glass.³ The combination of the intrinsic (by means of an AVL) and extrinsic vascularization (by a porous titanium chamber) mode enhances total vascularization, cell survival, and provides good conditions for bone tissue formation.^{1,14}

Furthermore, the implantation of endothelial cells, such as human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), provides another opportunity to facilitate the creation of a new vascular network because of their angiogenic potential.¹⁵⁻¹⁷ For bone tissue engineering applications, the coinplantation of HUVECs and mesenchymal stem cells is a promising approach. The literature describes enhanced proliferation and

osteogenic differentiation by cocultivation of both cell types.^{18,19} Human adipose-derived stem cells (ADSCs) were used because of their simple isolation with a low donor-site morbidity, their good *ex vivo* cell expansion and their osteogenic potential.²⁰⁻²²

This study targets to investigate the impact of HUVEC on vascularization and bone formation by ADSC-loaded osteogenic scaffolds in the AVL model.

Materials and Methods

Cell culture

ADSCs were obtained with the informed consent of the patients, according to hospital's Ethics Committee Guidelines [AZ: 126_16]. ADSCs were isolated from excess subcutaneous fat of abdominal free flaps during autologous breast reconstructions or abdominoplasty according to an established protocol.²⁰ The one male and two female donors had an average age of 50 ± 15.87 years. HUVECs were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany). The cells were cultured in a culture flask (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) at a density of 5000/cm² in a humidified atmosphere at 37°C and 5% carbon dioxide. ADSCs were cultured in minimum essential medium alpha (MEM α) (Life Technologies Limited, Paisley, UK) cell culture medium, enriched with 10% fetal calf serum (FCS) (Biocrom, Berlin, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany). For HUVECs, endothelial cell growth medium (ECGM) (PromoCell) was used containing endothelial basal medium, 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich), and supplements. Both cell types were raised until passage 4.

Before implantation, ADSCs were grown under osteogenic conditions over 14 days with ECGM, supplemented with 50 $\mu\text{g/mL}$ L-ascorbic acid, 10 mM glycerolphosphate, 1×10^{-8} M dexamethasone, and 0.01 μM 1,25-dihydroxyvitamin D3 (all supplements purchased from Sigma) according to an established protocol.¹⁴ Osteogenic differentiation was proofed and validated by an Alizarin Red assay and alkaline phosphatase (ALP) assay.

Fluorescence-activated cell-sorting analysis

The mesenchymal stem cell characteristics of the isolated ADSCs were analyzed by fluorescence-activated cell sorting (FACS). ADSCs were prepared in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich) in a concentration of 1000 cells/ μL . ADSCs were marked with fluorescent conjugated antibodies. The labeled ADSCs were passed through a laser light beam and the fluorescence intensity was measured by an electronic detector. The cells were analyzed on a FACScan[®] with CellQuest[®] software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) as described previously.²³

Alizarin Red staining and assay

Matrix mineralization was assessed with Alizarin Red S Staining Quantification Assay Kit according to the manufacturer's specifications (ScienCell, Carlsbad, CA). ADSCs growing under osteogenic conditions (ADSC OC) were, fixed, washed, and the Alizarin Red staining solution was added. ADSCs being cultured in ECGM cell culture medium without osteogenic supplements served as a control group. Both groups were sown in six-well plates in replicates of five with a density of 5000 cells/cm². Afterward, images were made with an Olympus IX81 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) and processed with Cell-Sens Dimension V1.5 software (Olympus). Acetic acid (ScienCell) was added, cells collected using a cell scraper, and the samples heated at 85°C for 10 min. After a cooling and centrifugation step the supernatant was collected, neutralized with 10% ammonium hydroxide (ScienCell), and absorbance measured at 405 nm.

ALP assay

ADSCs cultured in ECGM with (ADSC OC) and without (control group) osteogenic supplements were sown in replicates of five in six-well plates, with a density of 5000 cells/cm². The osteogenic differentiation was determined by using an ALP Assay Kit (Abcam, Cambridge, GB). According to the manufacturer's protocol, cells were washed, lysed, and pNPP solution added. After the ALP converted the pNPP substrate, the reaction was quenched and the absorbance measured at 405 nm to this end. The ALP activity was normalized to the protein content by the Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to a standard protocol.

Matrix preparation

HAp granules. Hemispherical shaped HAp granules were fabricated by a ceramic injection molding (CIM) process, which is usually for complex structures. The HAp feedstock consisted of 56.5 Vol% hydrophobized, calcined HAp powder (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), 39.1 Vol% paraffin (Granopent P; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany), and 4.4 Vol% carnauba wax (naturfarben; Carl Roth GmbH). For the casting mold manufacturing, a negative replica technique was used. Positive granular casting molds with a granular size of 1.5 × 1.5 × 0.75 mm were three-dimensional (3D)-printed with a z-resolution of 20 μm using a stereolithography (SLA) 3D-printer (Digitalwax® 028J; DWS S.r.l. Zanè, Italy) and afterward molded with a polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer (Elastosil M 4643 A/B; Wacker Chemie AG, München, Germany). Possible surface roughness was transferred to the surface of the granules according to the selected resolution. In contrast to direct 3D-printing (powder bed, robocasting), indirect printing can be used to produce smoother surfaces due to the higher z-resolution by a factor of 6–8. The feedstock was injection molded into the negative PDMS forms at 120°C. The as-fabricated granules were debinded at 500°C in air and afterward sintered at 1150°C for 2 h. A detailed description of the HAp injection mold process can be found elsewhere.^{9,24,25}

The microstructure of the sintered HAp granules was analyzed with an environmental scanning electron microscope (ESEM) (Quanta 200 FEG; FEI Company, Hillsboro, OR).

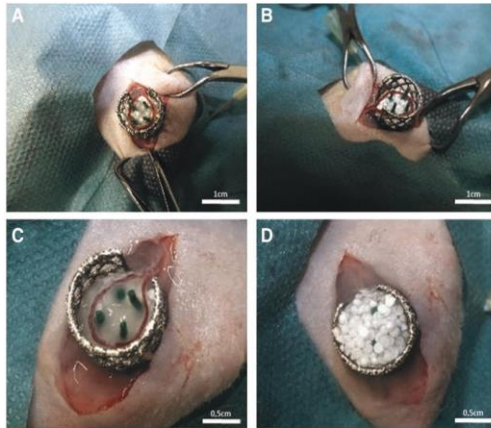
The pore sizes were determined by image analysis of the scanning electron microscope (SEM) micrographs analyzing a minimum area of 200 × 200 μm² (~4500 pores). The total porosity was geometrically determined on cylindrical reference samples with dimensions of 2.9 × 2.9 × 1.7 mm. Additionally, the 3D-pore structure and related pore network was analyzed by microcomputed tomography (μCT) using a Skyscan 1172 (Skyscan, Kontich, Belgium) equipped with a tungsten tube (λ = 0.024 nm), an 11 MP detector operating at 80 kV and 100 mA. The topography and surface quality were determined by confocal laser scanning microscopy (VK-X100; Keyence Corporation, Osaka, Japan).

Fibrin matrix. The fibrin was prepared as stated in fabricator's protocol of the Tisseel Kit (Baxter AG, Vienna, Austria). The fibrinogen was mixed with aprotinin and the thrombin diluted in calcium chloride. The fibrinogen and thrombin solutions were diluted in PBS (Sigma-Aldrich) in a 1:4 and 1:10 ratio, respectively. The solutions were kept in separate 1.0-mL Luer-Lock syringes and mixed during application in the Tisseel applicator (Baxter). The fibrin clotted after 4 to 5 s in a fibrinogen:thrombin ratio of 1:1. Before cell implantation, ADSCs and HUVECs were detached with accutase (Sigma-Aldrich) from the cell culture flasks (Greiner Bio-One), counted, centrifuged, and mixed with the diluted fibrinogen. The cells were implanted in a concentration of 2 × 10⁶ cells per construct. HUVECs and ADSCs were implanted in equal parts (1 × 10⁶ cells each) for group D. The cell-containing fibrinogen was filled into the Luer-Lock syringe of the Tisseel applicator and the fibrin application performed as previously described.

AVL implantation

The animal experiments were approved by the Animal Care Committee of the University of Erlangen and the Government of Mittelfranken, Germany (55.2-2532.1-53/14). For the study 32 male, T cell-deficient Rowett Nude (RNU) rats (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) were used. Four experimental groups were performed with eight animals per group. The rats aged between 7 and 9 months and had a body weight between 320 and 450 g. The microsurgery part of the AVL operation was carried out with a Carl Zeiss operating microscope (Oberkochen, Germany). With isoflurane (op-pharma; Burgdorf, Germany) the rats were anesthetized and the operation was performed according to a well-established protocol.²⁶ Briefly described, the saphenous vein and artery of the left hind limb were microsurgically anastomosed with a saphenous vein graft of the right hind limb. The titanium chamber had the dimension of 1.0 × 1.0 × 0.8 cm with pores facilitating extrinsic vascularization.²⁷ To prevent AVL dislocation, the chamber was prepared with four green pins (Braun, Melsungen, Germany). The chamber was then placed in the left groin and filled with a first layer of HAp granules. The diluted thrombin and fibrinogen (Baxter AG) were distributed around the granules. Fibrinogen directly converted to fibrin after 4 to 5 s. The AVL was placed around the pins and a second layer of fibrin (Baxter AG) was utilized to surround the vessel surface (Fig. 1). The cells in groups B–D were evenly distributed in the constructs. Finally, the chamber was filled completely with granules and fibrin,

FIG. 1. AVL operation. After the microsurgical anastomosis was successfully completed, the titanium chamber was fixed in proper position (**A, B**). The AVL was placed around the *green pins* and the chamber was filled layer per layer with fibrin and HAp granules (**C, D**). Scale bar **A, B**=1 mm, scale bar **C, D**=0.5 mm. AVL, arteriovenous loop; HAp, hydroxyapatite.



closed with the lid and fixed subcutaneously. The skin was closed, and the rats were precisely and accurately monitored during the implantation time of 6 weeks.

Explantation procedure

After 6 weeks the rats were perfused with Microfil® (Flow Tech, Inc., Carver, MA). The abdominal approach was carried out through a median laparotomy. After dissection of the caval vein and abdominal aorta, the aorta was cannulated with a G21 cannula (Braun). The caval vein was cut and the vascular system was flushed with 100 mL of Ringer heparin solution (100 IU/mL) (Braun). Twenty milliliters of Microfil MV-122 solution with 1 mL curing agent (Flow Tech, Inc.) were applied and the caudal caval vein and aorta were ligated. After storage at 4°C overnight, the constructs were explanted, weighed, and fixed in Roti®-Histofix 4% (Carl Roth GmbH) for 24 h. The constructs were transferred in 20% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) (Sigma-Aldrich) for decalcification. The constructs were decalcified up to 14 weeks.

Histological staining and analysis

After complete decalcification, the constructs were cut into two equal pieces and embedded in paraffin for histological staining. Three μm cross sections from the central construct part, vertical to the AVL, were performed with a microtome. For each histological staining two central cross-sections were used. Hematoxylin and Eosin (H&E) as well as Masson's Trichrome staining were carried out following standard protocols. For a better visualization of the newly formed vessels, α -smooth muscle actin staining (α -SMA), specific for human and murine smooth muscle cells, was performed. Briefly described, the deparaffinized and rehydrated histological slices were prepared with pronase and blocking solution (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany). Afterward, the

diluted (1:350) anti- α -SMA antibody was added overnight. Thereafter, a second ALP-labeled antibody (AP-Polymer) and Fast Red TR/Naphthol AS (Sigma) substrate was applied. Haemalaun was used for counterstaining.

To detect the implanted human cells after explantation, an immunofluorescence staining with the cluster of differentiation markers 31 and 105 was carried out. According to the manufacturer's instructions, a polyclonal human CD105 antibody (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) combined with the fluorescent Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific)-conjugated secondary immunoglobulin G (IgG) antibody was used for the detection of implanted ADSCs. The CD105 primary antibody had <0.2% crossreactivity with murine Endoglin and the Alexa Fluor 488-conjugated secondary IgG antibody was pretreated with a blocking solution to eliminate crossreactivity. Implanted HUVECs were identified using a monoclonal CD31 antibody (Dako Agilent, Santa Clara, CA), without rat crossreactivity (as declared by the manufacturer), combined with the NorthernLights™ NL557-conjugated secondary IgG antibody (R&D Systems). The latter one was pretreated with a blocking solution to eliminate crossreactivity. The images were taken with an Olympus IX81 microscope (Olympus) and processed with the software from cellSens Dimension V1.5 (Olympus).

To analyze the parameters vessel count, vessel distribution, and bone area, Microsoft Paint 3D (version 6.1), ImageJ (version 2) with the processing package Fiji and GNU image manipulation program (GIMP) (version 2.10) was used. Vessels were counted manually with Paint 3D. The JPG files of the H&E-stained slices were marked with one black dot in the size of 10 pxl for each vessel cross-section. After turning the file into 8-bit RGB the 10 pxl dots were measured automatically by ImageJ. With the help of Fiji each dot was attached to one x - and y -coordinate in the file. To analyze the vessel distribution, the mean of the distance between the coordinates of each vessel to the AVL was

calculated. The bone area in the histological slices was determined by five independent unblinded viewers and marked in GIMP and Paint 3D using the “intelligent scissors” tool. This tool marked the bone areas with color differences between adjacent pixels, which further strengthened the objectivity of the evaluation. Total bone area was automatically calculated with ImageJ. To determine the area of the newly formed tissue, the total construct size was measured using ImageJ.

Statistical analysis

GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software, San Diego, CA) was used for statistical analysis. *p*-Values ≤ 0.05 were considered as statistically significant.

Results

FACS analysis

The ADSC isolations were tested for certain mesenchymal stem cell markers.²⁸ The cells were positive for CD90 and CD73 ($99.93 \pm 0.06\%$), CD105 ($99.70 \pm 0.1\%$), and negative for CD31 ($99.30 \pm 0.7\%$). Osteogenic differentiation did not influence the mesenchymal stem cell properties. These ADSCs were positive for CD90 and CD73 ($97.33 \pm 2.9\%$), CD105 ($73.01 \pm 16.26\%$), and negative for CD31 ($99.37 \pm 0.1\%$).

Osteogenic differentiation

The matrix mineralization of the ADSC cell culture was evaluated by Alizarin Red staining and Alizarin Red assay after 14 days of cultivation under osteogenic conditions. Compared with the control group, the differentiated ADSCs (ADSC OC) had an increased deposit of extracellular calcium corresponding to the red coloring in the cell culture (Fig. 2A). The measurement of the absorption at 405 nm demonstrated a statistically significant difference between both groups in the Alizarin Red assay (0.12 ± 0.03 vs. 1.52 ± 1.36 ; $p \leq 0.001$) (Fig. 2B).

The osteogenic differentiation was further determined with the ALP assay. Compared with the control, the ADSC OC demonstrated a significant higher activity of the ALP ($0.04 \text{ U/mol} \pm 0.01$ vs. $0.61 \text{ U/mol} \pm 0.51$; $p \leq 0.001$)

(Fig. 2C). Both assays indicated the potential of the ADSCs to differentiate into osteogenic cells and initiate matrix mineralization.

Microstructure of the HAP granules

Hemispherical HAP granules were successfully fabricated combining CIM with 3D-printing and silicon molding. CIM is a cost-effective, near-net shape manufacturing technique providing high-dimensional accuracies even for submillimeter components with complex shapes.^{25,29} The high-dimensional and shape accuracy of the fabricated HAP granules is displayed in the SEM micrographs and topography (Fig. 3A, B).

The layerwise 3D-printing process of spherical shapes generates a rough surface with a gradual topography. The microstructure of the HAP granules was analyzed by SEM and μ CT (Fig. 3C, D) and is characterized by a homogenous distributed residual sintering porosity of $13.4 \pm 2.0\%$ with a mean pore size of $0.78 \pm 0.40 \mu\text{m}$.

Surgical outcome and macroscopic appearance

One animal died 5 days after implantation, resulting in only 31 constructs being explanted. In the postmortem examination no pathological changes were found. Besides, no major complications such as suture dehiscences or hematomas were found at all. Not only the surgical procedures, but also the implanted biomaterial was well tolerated by the RNU rats. The titanium chambers were fully surrounded by connective tissue after 6 weeks. The surface of the constructs was yellow colored by Microfil suggesting incipient vascularization (Fig. 4A). After dissecting the osteogenic matrices from the titanium chambers, we measured the construct weight. Interestingly, all cell-containing groups (group B $2.13 \pm 0.46 \text{ g}$, group C $1.80 \pm 0.40 \text{ g}$, group D $1.93 \pm 0.10 \text{ g}$) had a significant higher construct weight compared with the control group ($1.50 \pm 0.06 \text{ g}$) (Fig. 4B).

Histological analysis

We found 26 out of 31 patent AVLs (84%). In each group, there was one thrombosis of the AVL except in group A. In group A there were two thrombosed AVLs.

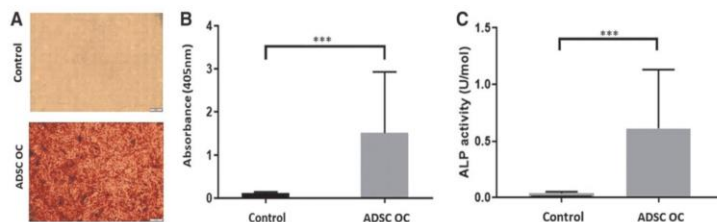
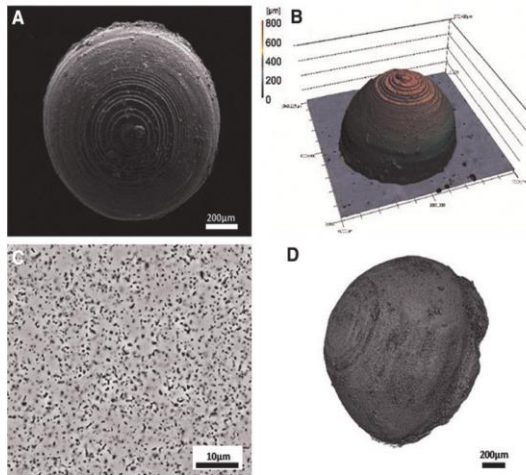


FIG. 2. Osteogenic differentiation. The Alizarin Red Assay depicts matrix mineralization of undifferentiated ADSCs (control) and the ADSCs growing under osteogenic conditions (ADSC OC) (A). Quantification of matrix mineralization (B) resulted in statistically significant higher values in the ADSC OC group. ALP activity, as a surrogate parameter for osteogenic differentiation, was also increased in the ADSC OC group (C). Statistically significant difference is indicated for *** $p \leq 0.001$. ADSC, adipose-derived stem cell; ALP, alkaline phosphatase.

FIG. 3. Granule ultrastructure. SEM-micrograph of a sintered HAp granule showing the rough surface and the print layers of the 3D-printed preforms, scale bar=200 μ m (A). SEM-micrograph of a sintered HAp granule indicated the rough surface and the print layers of the 3D-printed preforms (B). Microstructure of the HAp granules analyzed by μ CT (D), scale bar=200 μ m and SEM (C), scale bar=10 μ m, presented the residual sintering porosity. 3D, three-dimensional; μ CT, microcomputed tomography; SEM, scanning electron microscope.



For the histological and statistical analysis, we excluded the five constructs with an AVL thrombosis.

In all groups, fibrovascular tissue was found between the HAp granules. Moreover, the constructs were highly vascularized (Figs. 5 and 6). The α -SMA staining demonstrated that most of the newly formed vessels contained human and rat smooth muscle cells in their media layer. Moreover, Microfil was only intraluminal indicating intima integrity as well as a certain vessel maturation (Fig. 6).

The vessel number per cross-section was calculated as a surrogate parameter for vascularization. Although being not

significant for statistic reasons, the highest vessel number was detected in the HUVEC-containing group (group B) (Fig. 7). In this regard, we counted 1392 ± 518 vessels (group B), 1034 ± 453 vessels (group C), 916 ± 546 vessels (group A), and 908 ± 416 vessels (group D). Calculating the mean distance between the coordinates of each vessel to the AVL, the vessel distribution was quantified. Although a higher number of vessels reached the peripheral construct parts in groups C and D, a statistically significant difference compared with the control group A could not be proved herein. Interestingly, a significantly shorter distance of the

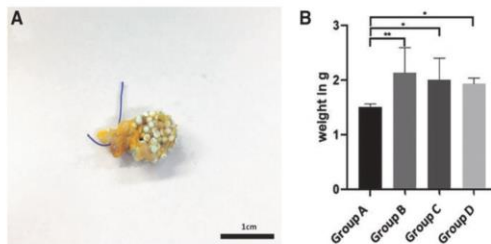


FIG. 4. Macroscopic appearance and construct weight. The constructs were detached from the titanium chamber. At the surface of the constructs yellow-colored vessels, filled with Microfil[®], are visible (A) (scale bar=1 cm). Compared with the control group (A), the measurements of the construct weights of groups B–D, lead to significant different results (B). Statistically significant differences are indicated for $*p \leq 0.05$ and $**p \leq 0.01$. (Group A=Fibrin + HAp; group B=Fibrin + HAp + 2×10^6 HUVEC; group C=Fibrin + HAp + 2×10^6 ADSC; group D=Fibrin + HAp + 1×10^6 HUVEC + 1×10^6 ADSC). HUVEC, human umbilical vein endothelial cell.

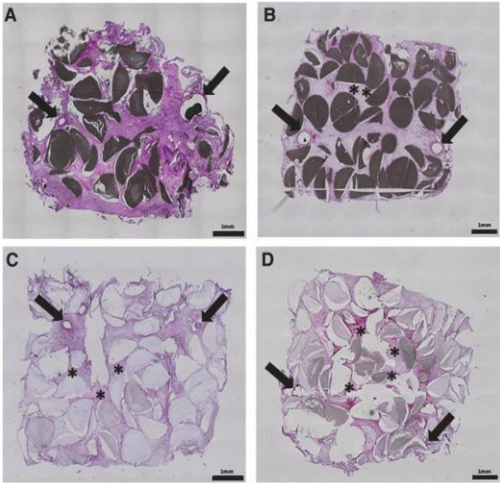


FIG. 5. Histological overview images. The histological slices of group A (A), group B (B), group C (C), and group D (D) were stained with H&E. The saphenous artery and vein of the AVL were marked with the black arrows and the newly formed vascularized bone tissue was marked with asterisks (*). Especially in group D, the bone tissue was accumulated in the center of the constructs, whereas in group B only small bone fragments were observed. Scale bar = 1 mm. H&E, Hematoxylin and Eosin.

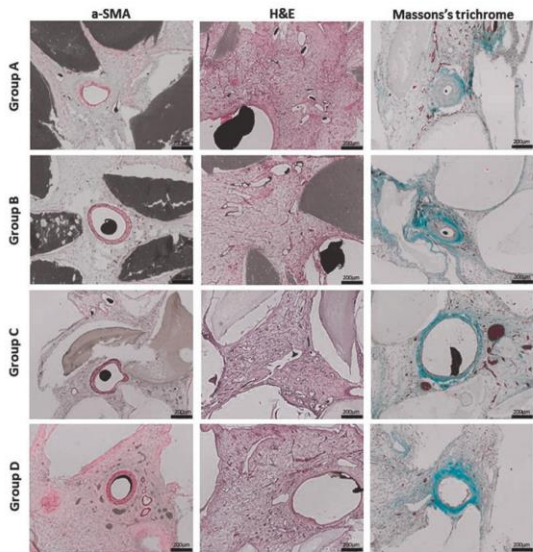


FIG. 6. Detailed view on vascularization. The histological slices were stained with α -SMA, H&E and Masson's Trichrome staining. The newly formed fibrovascular tissue in the surrounding of the AVL is depicted in the histological cross sections. The α -SMA staining dyes the smooth muscle cells in the vessel walls. The Microfil appears as a black area inside the vascular lumen and the HAP granules appear gray. The H&E staining dyes the cell nuclei dark and the cytoplasm light pink. The Masson's Trichrome staining dyes reticular and collagen fibers light green, cytoplasm, muscle cells and erythrocytes red and nuclei brown. Scale bar = 200 μ m. α -SMA, α -smooth muscle actin staining.

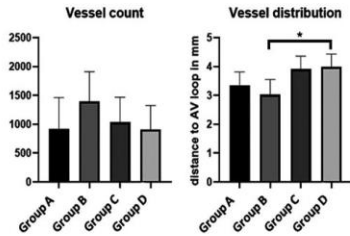


FIG. 7. Quantification of vascularization and vessel distribution. The diagram on the left depicts the total vessel number per histological cross-section. The right-sided diagram represents the mean vessel distribution. A higher distance of the vessels to the AVL in group D opposite to group B could be demonstrated (* $p \leq 0.05$).

newly formed vessels to the AVL in group B than in group D (3.02 ± 0.28 vs. 3.99 ± 0.44 mm; $p \leq 0.05$) (Fig. 7) could be found. By means of the fluorescence staining with hCD105 and hCD31, the implanted cells were detected in the specimen (Fig. 8).

In the cell containing constructs (groups B–D), we were able to prove newly formed bone tissue (Figs. 5B–D and 10). The quantification of the bone area resulted in a clear trend toward the groups C and D. In this context, a statistically significant larger bone area in group D compared with groups B and C (1.88 ± 0.43 vs. 0.59 ± 0.48 mm²; $p \leq 0.01$ and 1.88 ± 0.43 vs. 1.06 ± 0.62 mm²; $p \leq 0.05$) (Fig. 9) could be observed. The newly formed bone tissue was predominately located in the center of the constructs. As previously mentioned, no bone tissue was found in the control group without cells (group A).

Furthermore, within the histological sections especially the cell containing groups displayed remodeling processes of the HAp granules. The remodeling processes were particularly evident in the peripheral areas of the granules (Fig. 10).

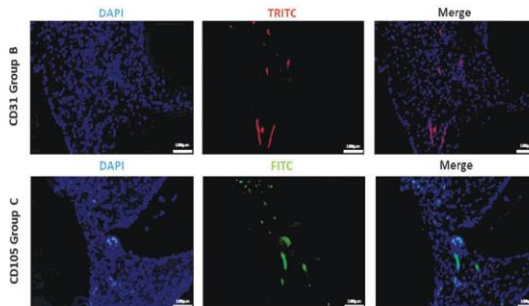
Discussion

The interaction of angiogenesis and osteogenesis is an indispensable parameter in the generation of bioartificial bone tissue. As extrinsic vascularization of tissue-engineered bone scaffolds always bears the risk of apoptosis of implanted cells and/or lower bone tissue formation, intrinsic vascularization seems to be a promising strategy.^{19,30} The AVL model representing an angiogenesis model, serves in a perfect manner for the investigation of biomaterial vascularization and osteogenesis, due to enhanced oxygen and nutrient supply of the implanted cells. Besides the AVL model, other angiogenesis models such as the arteriovenous (AV) bundle were also applied for bone tissue engineering applications.³¹ A direct comparison between the AV bundle and the AVL by Tanaka *et al.* demonstrated that the AVL model displays a higher vascularization potential.³²

This study is based on the hypothesis that bone formation is supported by the choice of appropriate biomaterials, such as fibrin and HAp,^{3,10} in combination with bone-forming cells. As being well described in the pertinent literature HUVECs support osteogenic differentiation, HUVECs and human ADSCs were used to increase bone formation in the AVL model.^{18,19,33,34} Endothelial cells and mesenchymal stem cells were previously used in several studies as a combination with different biomaterials for tissue engineering in animal models.^{14,19,33,35,36} But to the best of our knowledge, this study describes the coplantation of human ADSCs and HUVECs in the rat AVL model for the very first time. Previous studies have already demonstrated that the use of endothelial cells lead to an increase in vascularization.^{15,17,37} The ADSCs were convincing in contrast to MSCs used in other studies^{14,19,33,35} for various reasons. The ADSCs are easy to isolate from subcutaneous fat tissue, require undemanding cultivation, and have a great *ex vivo* expansion potential.^{38,39}

To exploit the full osteogenic potential of ADSCs, osteogenic differentiation can easily be performed by varying the cell culture medium. In a previous study, we were able to prove that HUVECs stimulate osteogenic differentiation, as well as the production of angiogenic markers in co-cultured ADSCs. Moreover, a ratio of 50% ADSCs and 50%

FIG. 8. Immuno-fluorescence staining. HUVECs (group B), labeled with CD31 and Northern-Lights™ NL557-conjugated secondary antibody, appeared red in TRITC channel. The CD105 and Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibody labeled ADSCs (group C) green in FITC channel. The nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar = 100 μ m. DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; FITC, fluorescein isothiocyanate; TRITC, tetramethylrhodamine.



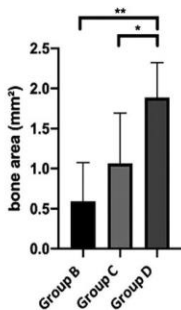


FIG. 9. Quantification of bone area. The total bone area was higher in the ADSC-containing groups (C and D) compared with the HUVEC group (B). Moreover, the highest bone content was found in the ADSC and HUVEC coimplantation group (D). Statistically significant differences are indicated for $*p \leq 0.05$ and $**p \leq 0.01$.

HUVECs had the highest impact on osteogenic and angiogenic effects.⁴⁰ Therefore, this cell ratio was adopted to our *in vivo* AVL study.

To prevent a rejection reaction due to implanted human cells, T cell-deficient RNU rats were used. As previous studies have demonstrated,^{7,8} fibrin has a good biocompatibility. During the implantation period of 6 weeks, neither wound healing disorders nor disturbances in the general condition of the animals were observed, indicating a good biocompatibility of the implanted biomaterials. Regarding biodegradation, especially in the cell-containing groups, remodeling processes on the HAp granules were detected. With an average pore size of $0.78 \pm 0.40 \mu\text{m}$ inside a single granule, it is important to remember that the granules have a packing density of $\sim 54\%$ and provide therefore space for cell invasion and remodeling processes in between the granules. It was demonstrated⁵¹ that an interconnected porosity, suitable for the cells, is necessary for nutrient supply and cell migration within the scaffold.

The experimental results showed that the remodeling processes were almost exclusively limited to the edge of the granules. To increase biodegradation and bone formation,

smaller HAp granules with a more advantageous surface-to-volume ratio or a bimodal size distribution resulting in a higher packing density might be preferable for future studies.

Although the formation of a new vascular network was limited by implantation time, construct size, and space for the tissue growth, the vascular network was distributed over all areas of the constructs and there was no difference in the vessel count between the groups. According to our results, Verseijden *et al.* described in the mouse vasculogenesis model that not only the implantation of HUVECs but also the implantation of fibrin-embedded human ADSCs contributes to vascularization.⁴² In addition to cell implantation, fibrin as a proangiogenic hydrogel also shows a positive effect on the formation of new vessels.⁴³ By linking the extrinsic and intrinsic vascularization mode, the titanium chamber allows continuous vascularization of the constructs.¹⁴ This was demonstrated by the fact that the peripheral areas of the constructs were also permeated with vessels. The distances between the newly formed vessels and the AVL were only significantly different between groups B and D, which may be due to the different distribution of the bone tissue fragments, the position of the AVL or HAp granules.

By and large, the implantation of HUVECs did not lead to an increase in the vessel count, in contrast to the other experimental groups. Interestingly, the implantation of HUVECs led to bone formation, suggesting that implanted HUVECs stimulated bone formation originating from rat osteoprogenitor cells. This result may be caused by the fact that the extracellular matrix from HUVECs stimulate the osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells.⁴⁴ The implantation of osteogenically differentiated ADSCs (group C) led to higher bone formation than the implantation of HUVECs (group B). But only the coimplantation of ADSCs and HUVECs (group D) led to a statistically significant larger bone area compared with the other cell-containing groups. This supports the results of earlier studies that endothelial cells stimulate proliferation, cell survival, and osteogenic differentiation of osteoprogenitor cells *in vitro* and bone formation *in vivo*.^{40,45–52}

In relation to the newly formed tissue, a proportionate bone area of a minimum of 4% (group B) to a maximum of 22% (group D) was found without using any growth factors such as bone morphogenic protein 2.¹⁴ Although coimplantation of ADSCs and HUVECs is a promising approach for bone tissue engineering, a number of factors, such as longer implantation time, the characteristics of the granules or the implantation of a higher cell count,⁵³ need to be modified in future studies to increase the *de novo* bone tissue.

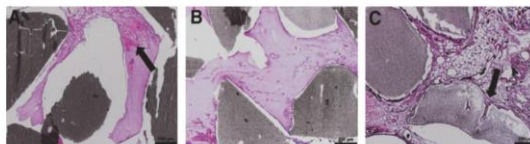


FIG. 10. Detailed view on bone formation. (A) Represents an exemplary histological cross-section of group B. The granules are gray, the small bone tissue regions were dyed pink. The black arrow marks the transition from fibrovascular tissue to bone tissue. (B) Depicts the newly formed bone tissue surrounding the HAp granules in group C. The black arrow marks the remodeling processes on a HAp granule in a construct of group D in (C). H&E staining. Scale bar = $200 \mu\text{m}$.

Conclusion

For the first time, bone tissue using ADSCs and HUVECs could be successfully generated in the rat AVL model. Bone formation was confirmed in all cell-containing groups with the largest bone area in the HUVEC and ADSC coimplantation group. Moreover, all constructs demonstrated a complete vascular network enabling optimal conditions for bone formation by the implanted cells. Taken together, ADSCs and their osteogenic potential in combination with HUVECs represent a promising approach for bone tissue engineering applications in the AVL model.

Acknowledgment

The authors cordially thank Dr. Alexander Haydl for proof reading the article.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by ELAN Fonds (17-10-18-I-Steiner). Furthermore, we acknowledge support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—project number 326998133—TRR 225 (sub-projects C03 and C04).

References

- Weigand, A., Beier, J.P., Hess, A., *et al.* Acceleration of vascularized bone tissue-engineered constructs in a large animal model combining intrinsic and extrinsic vascularization. *Tissue Eng Part A* **21**, 1680, 2015.
- Gazdag, A.R., Lane, J.M., Glaser, D., and Forster, R.A. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg* **3**, 1, 1995.
- Bührer, G., Rottensteiner, U., Hoppe, A., Detsch, R., Dafinova, D., and Fey, T. Evaluation of in vivo angiogenic effects of copper doped bioactive glass scaffolds in the AV loop model. *Biomed Glasses* **2**, 111, 2016.
- Arkudas, A., Prymachuk, G., Hoereth, T., *et al.* Dose-finding study of fibrin gel-immobilized vascular endothelial growth factor 165 and basic fibroblast growth factor in the arteriovenous loop rat model. *Tissue Eng Part A* **15**, 2501, 2009.
- Steiner, D., Lang, G., Fischer, L., *et al.* Intrinsic vascularization of recombinant eADF4(C16) spider silk matrices in the arteriovenous loop model. *Tissue Eng Part A* **25**, 1504, 2019.
- Bleiziffer, O., Horch, R.E., Hammon, M., *et al.* T17b murine embryonal endothelial progenitor cells can be induced towards both proliferation and differentiation in a fibrin matrix. *J Cell Mol Med* **13**, 926, 2009.
- Guan, X., Avci-Adali, M., Alarçin, E., *et al.* Development of hydrogels for regenerative engineering. *Biotechnol J* **12**, 5, 2017.
- Noori, A., Ashrafi, S.J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A., and Webster, T.J. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine* **12**, 4937, 2017.
- Biggemann, J., Pezoldt, M., Stumpf, M., Greil, P., and Fey, T. Modular ceramic scaffolds for individual implants. *Acta Biomater* **80**, 390, 2018.
- Appleford, M.R., Oh, S., Oh, N., and Ong, J.L. In vivo study on hydroxyapatite scaffolds with trabecular architecture for bone repair. *J Biomed Mater Res A* **89**, 1019, 2009.
- Granito, R.N., Muniz Renno, A.C., Yamamura, H., de Almeida, M.C., Menin Ruiz, P.L., and Ribeiro, D.A. Hydroxyapatite from fish for bone tissue engineering: a promising approach. *Int J Mol Cell Med* **7**, 80, 2018.
- Erol, O.O., and Sira, M. New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Plast Reconstr Surg* **66**, 109, 1980.
- Sarker, B., Papageorgiou, D.G., Silva, R., *et al.* Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *J Mater Chem B* **2**, 1470, 2014.
- Buchrer, G., Balzer, A., Arnold, L., *et al.* Combination of BMP2 and MSCs significantly increases bone formation in the rat arteriovenous loop model. *Tissue Eng Part A* **21**, 96, 2015.
- Steffens, L., Wenger, A., Stark, G.B., and Finkenzeller, G. In vivo engineering of a human vasculature for bone tissue engineering applications. *J Cell Mol Med* **13**, 3380, 2009.
- Fu, W.L., Xiang, Z., Huang, F.G., *et al.* Coculture of peripheral blood-derived mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells on strontium-doped calcium polyphosphate scaffolds to generate vascularized engineered bone. *Tissue Eng Part A* **21**, 948, 2015.
- Finkenzeller, G., Graner, S., Kirkpatrick, C.J., Fuchs, S., and Stark, G.B. Impaired in vivo vasculogenic potential of endothelial progenitor cells in comparison to human umbilical vein endothelial cells in a spheroid-based implantation model. *Cell Prolif* **42**, 498, 2009.
- Villars, F., Guillotin, B., Amedee, T., *et al.* Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C775, 2002.
- Koob, S., Torio-Padron, N., Stark, G.B., Hannig, C., Stankovic, Z., and Finkenzeller, G. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* **17**, 311, 2011.
- Weigand, A., Boos, A.M., Tasbihi, K., *et al.* Selective isolation and characterization of primary cells from normal breast and tumors reveal plasticity of adipose derived stem cells. *Breast Cancer Res* **18**, 32, 2016.
- Levi, B., James, A.W., Nelson, E.R., *et al.* Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One* **5**, e11177, 2010.
- De Francesco, F., Ricci, G., D'Andrea, F., Nicoletti, G.F., and Ferraro, G.A. Human adipose stem cells: from bench to bedside. *Tissue Eng Part B Rev* **21**, 572, 2015.
- Romani, N., Reider, D., Heuer, M., *et al.* Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* **196**, 137, 1996.
- Gelse, K., Biggemann, J., Stumpf, M., *et al.* Modular lattice constructs for biological joint resurfacing. *Tissue Eng Part A* **25**, 1053, 2019.
- Götz, M., Fey, T., and Greil, P. Vibration assisted self-assembly processing of ceramic-based composites with modular meta-structure. *J Am Ceram Soc* **95**, 95, 2012.
- Weigand, A., Beier, J.P., Arkudas, A., *et al.* The arteriovenous (AV) loop in a small animal model to study angiogenesis and vascularized tissue engineering. *J Vis Exp* **117**, 54676, 2016.
- Arkudas, A., Prymachuk, G., Beier, J.P., *et al.* Combination of extrinsic and intrinsic pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plast Reconstr Surg* **129**, 55e, 2012.

28. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315, 2006.
29. Matula, G., and Krzyżeczko, J. Porous material produced by ceramic injection molding. *J Achiev Mater Manuf Eng* **71**, 14, 2015.
30. Arkudas, A., Beier, J.P., Heidner, K., *et al.* Axial pre-vascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng* **13**, 1549, 2007.
31. Epple, C., Haumer, A., Ismail, T., *et al.* Prefabrication of a large pedicled bone graft by engineering the germ for de novo vascularization and osteoinduction. *Biomaterials* **192**, 118, 2019.
32. Tanaka, Y., Sung, K.C., Tsutsumi, A., Ohba, S., Ueda, K., and Morrison, W.A. Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plast Reconstr Surg* **112**, 1636, 2003.
33. Ma, J., Yang, F., Both, S.K., *et al.* In vitro and in vivo angiogenic capacity of BM-MSCs/HUVECs and AT-MSCs/HUVECs cocultures. *Biofabrication* **6**, 015005, 2014.
34. Strassburg, S., Nienhueser, H., Bjorn Stark, G., Finkenzeller, G., and Torio-Padron, N. Co-culture of adipose-derived stem cells and endothelial cells in fibrin induces angiogenesis and vasculogenesis in a chorioallantoic membrane model. *J Tissue Eng Regen Med* **10**, 496, 2016.
35. Liu, X., Chen, W., Zhang, C., *et al.* Co-seeding human endothelial cells with human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells on calcium phosphate scaffold enhances osteogenesis and vascularization in rats. *Tissue Eng Part A* **23**, 546, 2017.
36. Cornejo, A., Sahar, D.E., Stephenson, S.M., *et al.* Effect of adipose tissue-derived osteogenic and endothelial cells on bone allograft osteogenesis and vascularization in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* **18**, 1552, 2012.
37. Rouwkema, J., de Boer, J., and Van Blitterswijk, C.A. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* **12**, 2685, 2006.
38. Schneider, S., Unger, M., van Griensven, M., and Balmayor, E.R. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *Eur J Med Res* **22**, 17, 2017.
39. Ong, W.K., Tan, C.S., Chan, K.L., *et al.* Identification of specific cell-surface markers of adipose-derived stem cells from subcutaneous and visceral fat depots. *Stem Cell Reports* **2**, 171, 2014.
40. Mutschall, H., Winkler, S., Weisbach, V., Arkudas, A., Horch, R.E., and Steiner, D. Bone tissue engineering using adipose-derived stem cells and endothelial cells: effects of the cell ratio. *J Cell Mol Med* **24**, 7034, 2020.
41. Zheng, P., Yao, Q., Mao, F., *et al.* Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D printed poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite scaffolds combined with bone marrow clots. *Mol Med Rep* **16**, 5078, 2017.
42. Verseijden, F., Posthumus-van Sluijs, S.J., van Neck, J.W., Hofer, S.O., Hovius, S.E., and van Osch, G.J. Vascularization of prevascularized and non-prevascularized fibrin-based human adipose tissue constructs after implantation in nude mice. *J Tissue Eng Regen Med* **6**, 169, 2012.
43. van Hinsbergh, V.W., Collen, A., and Koolwijk, P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **936**, 426, 2001.
44. Lampert, F.M., Simunovic, F., Finkenzeller, G., *et al.* Transcriptomic changes in osteoblasts following endothelial cell-cocultivation suggest a role of extracellular matrix in cellular interaction. *J Cell Biochem* **117**, 1869, 2016.
45. Shahabipour, F., Oskuee, R.K., Dehghani, H., Shokrgozar, M.A., Aninwene, G.E., 2nd, and Bonakdar, S. Cell-cell interaction in a coculture system consisting of CRISPR/Cas9 mediated GFP knock-in HUVECs and MG-63 cells in alginate-GelMA based nanocomposites hydrogel as a 3D scaffold. *J Biomed Mater Res A* **108**, 1596, 2020.
46. Simunovic, F., Wimmering, O., Strassburg, S., *et al.* Increased differentiation and production of extracellular matrix components of primary human osteoblasts after cocultivation with endothelial cells: a quantitative proteomics approach. *J Cell Biochem* **120**, 396, 2019.
47. Hager, S., Lampert, F.M., Orimo, H., Stark, G.B., and Finkenzeller, G. Up-regulation of alkaline phosphatase expression in human primary osteoblasts by cocultivation with primary endothelial cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mRNA stabilization. *Tissue Eng Part A* **15**, 3437, 2009.
48. Lampert, F.M., Kutscher, C., Stark, G.B., and Finkenzeller, G. Overexpression of HIF-1alpha in mesenchymal stem cells affects cell-autonomous angiogenic and osteogenic parameters. *J Cell Biochem* **117**, 760, 2016.
49. Grellier, M., Granja, P.L., Fricain, J.C., *et al.* The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials* **30**, 3271, 2009.
50. Gershovich, J.G., Dahlin, R.L., Kasper, F.K., and Mikos, A.G. Enhanced osteogenesis in cocultures with human mesenchymal stem cells and endothelial cells on polymeric microfiber scaffolds. *Tissue Eng Part A* **19**, 2565, 2013.
51. Steiner, D., Lampert, F., Stark, G.B., and Finkenzeller, G. Effects of endothelial cells on proliferation and survival of human mesenchymal stem cells and primary osteoblasts. *J Orthop Res* **30**, 1682, 2012.
52. Stahl, A., Wenger, A., Weber, H., Stark, G.B., Augustin, H.G., and Finkenzeller, G. Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 684, 2004.
53. Haug, V., Torio-Padron, N., Stark, G.B., Finkenzeller, G., and Strassburg, S. Comparison between endothelial progenitor cells and human umbilical vein endothelial cells on neovascularization in an adipogenesis mouse model. *Microvasc Res* **97**, 159, 2015.

Address correspondence to:

Dominik Steiner, MD

Department of Plastic and Hand Surgery
University Hospital of Erlangen
Friedrich-Alexander-University
Erlangen-Nürnberg (FAU)
Krankenhausstr. 12
Erlangen D-91054
Germany

E-mail: dominik.steiner@uk-erlangen.de

Received: April 1, 2020

Accepted: July 21, 2020

Online Publication Date: September 18, 2020

3.2 Publikation 2

Tissue Eng Part A. 2019 Nov;25(21-22):1504-1513. doi: 10.1089/ten.TEA.2018.0360.
Epub 2019 May 2.

Intrinsic Vascularization of Recombinant eADF4(C16) Spider Silk Matrices in the Arteriovenous Loop Model

Dominik Steiner ¹, Gregor Lang ², Laura Fischer ¹, Sophie Winkler ¹, Tobias Fey ^{3, 4}, Peter Greil ³, Thomas Scheibel ^{5, 6, 7, 8, 9}, Raymund E Horch ¹, Andreas Arkudas ¹

Affiliations

Affiliations

- 1 Department of Plastic and Hand Surgery, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.
- 2 Biopolymer Processing, Faculty of Engineering Science, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.
- 3 Department of Materials Science and Engineering, Institute of Glass and Ceramics, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.
- 4 Frontier Research Institute for Materials Science, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.
- 5 Department for Biomaterials, Faculty of Engineering Science, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.
- 6 Bayreuth Center for Colloids and Interfaces, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.
- 7 Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.
- 8 Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.
- 9 Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.

PMID: 30848159 DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0360

Abstract

The surgically induced angiogenesis by means of arteriovenous (AV) loops represents a powerful method to significantly enhance vascularization of biomaterials. Regarding tissue engineering applications, spider silk is a promising biomaterial with a good biocompatibility and slow biodegradation. This study aims at investigating vascularization as well as *de novo* tissue formation of fibrous matrices made of electro-spun (ES) or wet-spun (WS) engineered ADF4(C16) spider silks in the rat AV loop model. Either ES or WS spider silk fibrous matrices were filled into Teflon chambers. Intrinsic vascularization was induced by means of an AV loop. After 4 weeks of vascularization, *de novo* tissue formation and biocompatibility were analyzed. Regardless of their significantly differing fiber diameters, both ES and WS eADF4(C16) fiber matrices displayed a good biocompatibility and initiated *de novo* tissue formation as well as vessel formation. Both matrices demonstrated partial vascularization originating from the AV loop, with more vessels in spider silk matrices with lower fiber diameters. We were able to demonstrate intrinsic vascularization of spider silk fibrous matrices by means of the AV loop. Moreover, our study indicates that the adjustment of the fiber diameter of engineered spider silks enables new possibilities to optimize vascularization. Impact Statement Spider silk is a promising biomaterial demonstrating excellent biocompatibility and biodegradation. Biotechnology allows the high-volume production of recombinant spider silk proteins, such as eADF4(C16), with the required purity for biomedical applications. In this study, eADF4(C16) fibrous matrices were produced by either electro- or wet-spinning, resulting in different fiber diameters. Forming an arteriovenous fistula, surgical vascularization of the scaffolds was induced. After 4 weeks, both silks demonstrated a good biocompatibility and tissue formation. The thinner electro-spun fibers displayed a faster biodegradation and vascularization, indicating that the adjustment of the fiber diameter is a valuable tool to fine-tune vascularization and biodegradation.

Keywords: AV loop; angiogenesis; engineered spider silk proteins; submicron fibers; tissue engineering.

TISSUE ENGINEERING: Part A
Volume 25, Numbers 21 and 22, 2019
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tea.2018.0360



ORIGINAL ARTICLE

Intrinsic Vascularization of Recombinant eADF4(C16) Spider Silk Matrices in the Arteriovenous Loop Model

Dominik Steiner, MD,¹ Gregor Lang, PhD,² Laura Fischer, VMD,¹ Sophie Winkler, VMD,¹ Tobias Fey, PhD,^{3,4} Peter Greil, PhD,³ Thomas Scheibel, PhD,⁵⁻⁹ Raymund E. Horch, MD,¹ and Andreas Arkudas, MD¹

The surgically induced angiogenesis by means of arteriovenous (AV) loops represents a powerful method to significantly enhance vascularization of biomaterials. Regarding tissue engineering applications, spider silk is a promising biomaterial with a good biocompatibility and slow biodegradation. This study aims at investigating vascularization as well as *de novo* tissue formation of fibrous matrices made of electro-spun (ES) or wet-spun (WS) engineered ADF4(C16) spider silks in the rat AV loop model. Either ES or WS spider silk fibrous matrices were filled into Teflon chambers. Intrinsic vascularization was induced by means of an AV loop. After 4 weeks of vascularization, *de novo* tissue formation and biocompatibility were analyzed. Regardless of their significantly differing fiber diameters, both ES and WS eADF4(C16) fiber matrices displayed a good biocompatibility and initiated *de novo* tissue formation as well as vessel formation. Both matrices demonstrated partial vascularization originating from the AV loop, with more vessels in spider silk matrices with lower fiber diameters. We were able to demonstrate intrinsic vascularization of spider silk fibrous matrices by means of the AV loop. Moreover, our study indicates that the adjustment of the fiber diameter of engineered spider silks enables new possibilities to optimize vascularization.

Keywords: engineered spider silk proteins, angiogenesis, tissue engineering, AV loop, submicron fibers

Impact Statement

Spider silk is a promising biomaterial demonstrating excellent biocompatibility and biodegradation. Biotechnology allows the high-volume production of recombinant spider silk proteins, such as eADF4(C16), with the required purity for biomedical applications. In this study, eADF4(C16) fibrous matrices were produced by either electro- or wet-spinning, resulting in different fiber diameters. Forming an arteriovenous fistula, surgical vascularization of the scaffolds was induced. After 4 weeks, both silks demonstrated a good biocompatibility and tissue formation. The thinner electro-spun fibers displayed a faster biodegradation and vascularization, indicating that the adjustment of the fiber diameter is a valuable tool to fine-tune vascularization and biodegradation.

Introduction

THE RECONSTRUCTION of large-volume tissue defects, resulting from radical tumor resection or trauma, with autologous tissue is often associated with considerable donor

site morbidity, and thereby restricted regarding its application. A promising strategy to solve this problem is the generation of bioartificial tissues; also known as tissue engineering. Although encouraging results of tissue engineering have been achieved, the near-term integration of the tissue-engineered

¹Department of Plastic and Hand Surgery, University Hospital of Erlangen, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

²Biopolymer Processing, Faculty of Engineering Science, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.

³Department of Materials Science and Engineering, Institute of Glass and Ceramics, Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU), Erlangen, Germany.

⁴Frontier Research Institute for Materials Science, Nagoya Institute of Technology, Nagoya, Japan.

⁵Department for Biomaterials, Faculty of Engineering Science, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.

⁶Bayreuth Center for Colloids and Interfaces, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.

⁷Bavarian Polymer Institute, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.

⁸Bayreuther Zentrum für Molekulare Biowissenschaften (BZMB), University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.

⁹Bayreuther Materialzentrum (BayMAT), University of Bayreuth, Bayreuth, Germany.

INTRINSIC VASCULARIZATION OF RECOMBINANT SPIDER SILK

1505

constructs into the host vascular system still represents one of the major hurdles. To improve vascularization of tissue-engineered constructs, different strategies have been described. Besides the integration of endothelial cells^{1,2} or angiogenic growth factors,³ the surgically induced angiogenesis seems to be a promising strategy to improve vascularization.^{4,5}

The formation of an arteriovenous (AV loop) fistula by interposing a vein graft between the saphenous artery and vein is a promising method to vascularize bioartificial replacement tissues. In the past, intrinsic vascularization of diverse biomaterials such as fibrin gel, hyaluronic acid gel, hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate (HA/ β -TCP), or 45S5 bioactive glass was demonstrated.⁶⁻⁹ Bearing in mind that survival of transplanted cells is critically dependent on adequate oxygen and nutrition supply, it could be confirmed that the AV loop can enhance cell survival of transplanted osteoblasts.¹⁰ Further, we were able to enhance the angiogenic potential of the AV loop on addition of the basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor (VEGF) 165.^{3,11}

Besides the improvement of vascularization, the choice of the scaffold is indispensable for tissue engineering applications. An ideal scaffold should facilitate oxygen and nutrition supply, represent a tissue-like environment, and protect the cells from mechanical influences on transplantation.

In addition to good biocompatibility and biodegradation, there should be an inverse correlation between *de novo* tissue formation and scaffold degradation.¹² Moreover, the ideal scaffold should promote cell adhesion, angiogenesis, and *de novo* tissue formation.

In this context, spider silk may represent an ideal biomaterial for tissue engineering applications as it displays an excellent biocompatibility as well as biodegradation.¹³⁻¹⁷ The recombinant production of large quantities of engineered spider silk proteins as well as the developed processing technologies nowadays enable the application of spider silk materials in different areas.¹⁸ One of the spider silk proteins is the so-called engineered ADF4(C16) [eADF4(C16), MW 48 kDa], a recombinant protein based on the consensus sequence of *Araneus diadematus* Fibroin 4 (ADF4), which can be produced in high quantity and purity and has been used to produce fibers, particles, films, or hydrogels with different features.¹⁹⁻²¹ Further, eADF4(C16) can be modified with integrin recognition sites such as the RGD-sequence, yielding improved cellular adhesion and proliferation.^{22,23} In another work, cell encapsulation in and bioprinting of eADF4(C16) hydrogels, both being important tools for tissue engineering applications, were successfully established with a higher cell viability in comparison to that of established biomaterials such as gelatin or alginate.²⁴ When subcutaneously implanted, eADF4(C16)-coated silicone implants revealed both reduced foreign body reaction and reduced fibrous capsule formation.²⁵

In this study, fibrous matrices for tissue regeneration were produced by either electro- or wet-spinning of eADF4(C16). The fibrous matrices were placed in Teflon isolation chambers, and intrinsic vascularization was induced by means of the AV loop. The constructs were placed in the left groin of Lewis rats, and biocompatibility, biodegradation, *de novo* tissue formation, and angiogenesis were analyzed by using histology and microcomputed tomography (μ CT) 4 weeks after implantation.

Materials and Methods

Spider silk matrix preparation

The recombinant spider silk protein eADF4(C16) consists of 16 repeats of a C module (sequence: GSSAAAAAAS GPGGYGPENQGPSGPGGYGPGGP), which mimics the repetitive core sequence of the European garden spider's (*A. diadematus*) dragline silk fibroin 4 (ADF4).^{26,27} The production and purification of eADF4(C16) (MW: 47,698 g/mol) was performed as previously described.^{22,28} Before processing, the recombinant protein was stored as lyophilized particles at -20°C . To produce dopes for electro-spun (ES) and wet-spun (WS) fibers, eADF4(C16) was dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at a concentration of 100 mg/mL. Electro-spinning was performed in a custom-built device by continuous extrusion (420 $\mu\text{L/h}$) of the spinning dope through a 21G needle, which was charged at 30 kV. Fibers were collected in an ethanol coagulation bath (Sigma-Aldrich), and they were placed on an oppositely charged (-20 kV) metal plate at a distance of 150 mm. For one matrix sample, 21 mg eADF4(C16) were ES, taken out of the coagulation bath, and washed three times. Sterilization and storage were performed in 70% ethanol at 4°C . Wet-spinning was performed by vertical extrusion (200 $\mu\text{L/h}$) of the same spinning dope through a 23G needle into an 80% 2-propanol coagulation bath. For one matrix sample, 50 mg eADF4(C16) were WS, taken out of the coagulation bath, and washed three times. Sterilization and storage were performed in 70% ethanol at 4°C . The respective fiber diameters were determined by light microscopy of wet matrices and subsequent measurement of the diameters of 50 individual fibers, each applying the image processing software ImageJ.

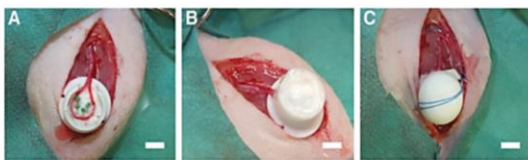
AV loop surgery

The Animal Care Committee of the University of Erlangen and the Government of Mittelfranken approved the animal experiments (AZ 54-2532.1-9/13-2). The experiments were carried out according to the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. Nineteen male Lewis rats (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) with a body weight ranging from 379 to 525 g underwent surgery. One veterinarian performed surgery under general anesthesia with isoflurane (Baxter, Vienna, Austria). The micro-surgical anastomosis for the AV loop was performed by using an operating microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Briefly, the saphenous vessels were identified and prepared in the right and left groin. The right saphenous vein was gathered as a vein graft and interposed between the left saphenous artery and vein, creating one AV loop per animal. Thereafter, the spider silk fibrous matrices were filled into Teflon chambers and the AV loops were placed on the spider silk matrices; further, spider silk fibers were placed on the AV loop, the chamber was closed with a lid, fixed on the thigh musculature and the skin was closed (Fig. 1).

Nine Lewis rats were treated with the ES eADF4(C16) spider silk matrices, and ten Lewis rats were treated with the WS eADF4(C16) spider silk matrices (WS).

The animals received enoxaparin adapted to the body weight (10 mg/kg) for 2 days postoperatively. Four weeks

FIG. 1. Implantation of the AV loop in the groin of Lewis rats (scale bar = 5 mm). A Teflon chamber was half-filled with the eADF4(C16) fibrous matrix. Then, the AV loop was placed (A), filled up with further spider silk fibers (B) and the lid was closed (C). AV, arteriovenous.



after AV loop implantation, Microfil® (Flow Tech, Inc., Carver) was injected intravascularly to visualize vascularization originating from the AV loop. Briefly, a longitudinal laparotomy was performed, the descending aorta was punctured with a cannula, the inferior caval vein was cut, and the vascular system was flushed with Ringer-heparin (100 IU/mL) solution. Thereafter, 20 mL Microfil MV-122 solution with 0.6 mL curing agent was applied into the descending aorta. After the specimens were placed at 4°C overnight, the constructs were explanted and embedded in formalin for μ CT and histological analysis.

Microcomputed tomography

Vessel structure in the construct was determined by high-resolution μ CT scans using a Skyscan 1172 (Skyscan B.V., Leuven, Belgium) equipped with an 11-MP detector and a tungsten tube at a voltage of 80 kV and a current of 100 mA without any additional source filtering due to the low X-ray contrast of the filled vessels. Each scan was performed at 180° with a rotation step of 0.4° and a resolution of 8 μ m/voxel. The measured raw data sonograms were reconstructed by Radon back Transformation using the tomographic reconstruction software (NRecon Client and Server 1.6.10.1 with GPU support; Skyscan, Leuven, Belgium) after adjusting the X/Y alignment during measurement. After reduction to 256 Gy value levels and adjusting the gray value range, the two-dimensional cross-sections were calculated. The three-dimensional (3D) visual images were generated by imaging software (Amira 6.2; Visage Imaging, Berlin, Germany). Binary label images assigned with a global threshold and a 26-side growing algorithm on all layers separated vessels from organic material. Additional skeletonization (Module autoskeleton Amira) was performed to determine the network structure of the vessels using global thinning algorithms. The vessel network was divided into segments with individual length and mean diameter. Using a histogram class width of 1 μ m, an accumulated vessel length was calculated for each vessel radius class.

Histological staining

After μ CT analysis, the specimens were embedded in paraffin and histological staining was carried out. Then, 3- μ m cross-sections, perpendicular to the longitudinal axis of the AV loop, were gained by using a microtome. Hematoxylin and eosin as well as Masson's trichrome staining were performed according to standard protocols. To characterize the architecture of the newly formed vessels, smooth muscle cells were stained with an anti- α -smooth muscle actin (SMA) antibody (Dako GmbH). After depar-

affinization and rehydration, the slides were treated with a blocking solution (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany), followed by application of the diluted (1:300) anti- α -SMA antibody and overnight incubation of the specimen. Then, a second alkaline phosphatase-labeled anti-mouse antibody (AP-Polymer) was added, Fast Red TR/Naphthol AS (Sigma) substrate was applied, and hemalaun was used for counterstaining. Macrophages were visualized with an ED1 immunostaining. Briefly, the deparaffinized and rehydrated slides were incubated in a blocking solution (Zytomed Systems GmbH) before the addition of the anti-ED1 primary antibody (1:300 dilution; Serotec). After incubation overnight, a second alkaline phosphatase-labeled anti-mouse antibody (AP-Polymer) was added and Fast Red TR/Naphthol AS (Sigma) substrate was applied. Hemalaun was used for counterstaining.

An Olympus IX81 microscope (Olympus, Hamburg, Germany) was used with a digital camera for the histological analysis. The microphotographs of each histological cross section were performed at 40- and 100-fold magnification. High-resolution overview images (40-fold magnification) were gained by using the cellSens Dimension V1.5 software (Olympus).

Automatic quantification of the vascularization and tissue formation

ImageJ Version 2 (NIH, Bethesda, MD) was used to quantify the vascularization originating from the AV loop. The images were transformed into RGB color space, and "negative experts" (cell nuclei) and "positive experts" (intravascular Microfil) were defined. After exclusion of the "negative experts," the total vessel number and the vessel cross-section area were automatically calculated. In addition, the GNU Image Manipulation Program Version 2.8.22 (GIMP) was used to analyze the connective tissue area and the construct size. Based on the specific color value, the connective tissue area in the image was selected by the GIMP color picker tool and quantified with ImageJ. The construct size was determined by erasure of the background with GIMP. The automatic measurement was carried out by using ImageJ.

Statistical methods

Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). The results are shown as mean arbitrary units \pm standard deviation. In the WS group, 8 out of 10 specimens had to be excluded from statistical analysis due to experimental issues such as construct dislocation. Therefore, no statistically significant evaluation comparing the WS and ES groups was possible.

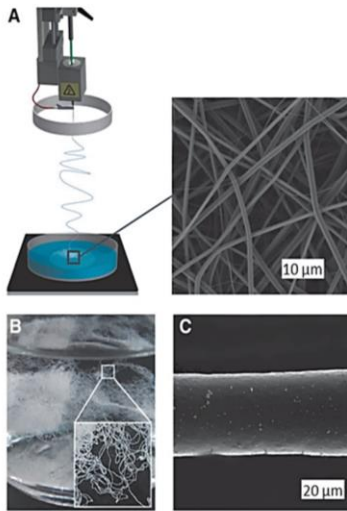


FIG. 2. Schematic illustration of the electrospinning process and electron microscopic image (scale bar = 10 μm) of suspended ES fibers (A). Photograph (B) and electron microscopic image [(C), scale bar = 20 μm] of suspended WS fibers. The ES fibers displayed smaller diameters ($1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ vs. $44 \pm 6 \mu\text{m}$). ES, electro-spun; WS, wet-spun.

However, an unpaired student's *t*-test could be used for statistical analysis comparing the ES group and other biomaterials from previous AV loop studies. Here, *p*-values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Results

Production of fibrous matrices

To determine the morphological impact of fibrous spider silk matrices on *de novo* tissue formation and an-

giogenesis, two different types of fibers were generated by applying electrospinning (ES) to produce thin fibers, and wet-spinning (WS) to obtain larger fiber diameters. In both processes, the same recombinant protein and solvent system, eADF4(C16) in HFIP, was used. Electrospinning into a 100% ethanol coagulation bath resulted in smooth fibers with homogeneous fiber diameters of $1.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (Fig. 2A). During electrospinning, fibers were deposited in a continuous manner within the bath, thereby sinking down from the surface and forming a 3D fibrous matrix. The highly entangled water stable fiber matrix could subsequently be removed in one piece. Wet-spinning also resulted in homogenous fibers but with diameters of $44 \pm 6 \mu\text{m}$ (Fig. 2B, C) that were collected in 80% 2-propanol, forming a loosely packed matrix of entangled fibers.

Surgical outcome and macroscopic appearance

Except one animal from the WS eADF4(C16) spider silk group, all animals survived the operative procedure. In the WS group, two animals displayed wound-healing disturbance and/or construct dislocation. The animal with the dislocated construct has been excluded from further analysis. In general, the animals tolerated the Teflon chambers well and no other complications occurred. The explanted constructs displayed a smooth surface, and after intravascular perfusion with the yellow-colored Microfil the vessel pedicle of the AV loop was evident in all groups (Fig. 3). Interestingly, the construct surface was not yellow as a surrogate parameter for incomplete construct vascularization. The construct weight showed no difference between the ES and the WS group ($0.54 \pm 0.05 \text{ g}$ vs. $0.56 \pm 0.05 \text{ g}$).

Histology

Four weeks after implantation, a partial degradation of the spider silk constructs could be observed. In comparison with the WS group, constructs containing the ES eADF4(C16) spider silk displayed a smaller cross-sectional area ($39.7 \pm 3.2 \text{ mm}^2$ vs. $50.3 \pm 3.5 \text{ mm}^2$).

Interestingly, most parts of the construct area were not replaced by fibrovascular tissue or infiltrated by cells or vessels (Figs. 4–6). The newly formed fibrovascular tissue was predominantly located around the AV loop, and both groups showed similar results regarding the cross-sectional area of newly formed fibrovascular tissue ($4.5 \pm 1.3 \text{ mm}^2$ vs. $4.3 \pm 0.1 \text{ mm}^2$).

Macrophages were labeled with an anti-ED1 antibody, and immunostaining was carried out. Macrophages were

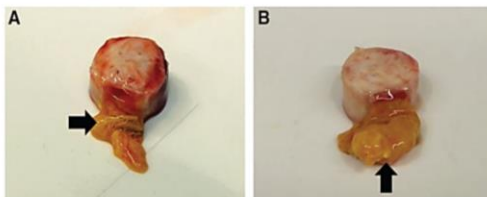
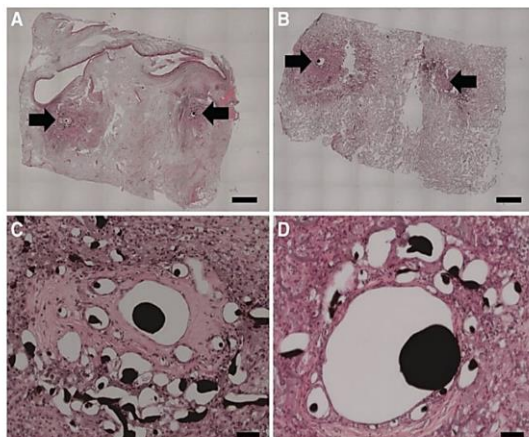


FIG. 3. Macroscopic appearance of the explanted constructs. Both ES and WS constructs displayed a yellow vascular pedicle. The vascular pedicle is labeled with a **bold arrow**. The surface of the ES (A) and WS (B) eADF4(C16) fibers did not appear yellow, as an indication of incomplete vascularization of the constructs. ADF4, *Araneus diadematus* fibroin 4.

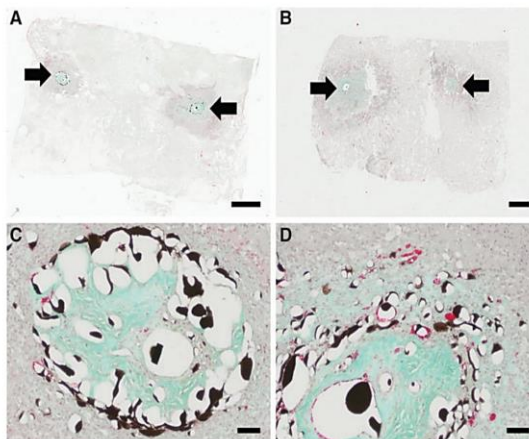
FIG. 4. Hematoxylin and eosin staining at 40 [(A, B); scale bar ≈ 1 mm] and 100-fold [(C, D); scale bar $\approx 50 \mu\text{m}$] magnification. The AV loop is labeled with **bold arrows**. The newly formed vessels and connective tissue were located close to the AV loop. (A, C) ES spider silk fibers; (B, D) WS spider silk fibers.



present in both groups, with most being located at the interface between the spider silk matrices and the newly formed fibrovascular tissue. Multinuclear giant cells, as a surrogate parameter for severe immunoreaction, were absent in both groups. Moreover, no differences regarding the distribution or quantity of macrophages between both spider silk matrices could be detected (Fig. 7).

The ES group showed a patency rate of 67% (6/9) in comparison to 25% (2/8) within the group of WS matrices. The vessel lumen was filled with Microfil, and no Microfil was located in the interstitium as a confirmation of vessel patency and intima integrity. Further, the newly formed vessels displayed smooth muscle cells at the media layer, as indicated by α -SMA immunostaining (Fig. 8). In general,

FIG. 5. Masson trichrome staining at 40 [(A, B) scale bar ≈ 1 mm] and 100-fold magnification [(C, D); scale bar $\approx 50 \mu\text{m}$]. Newly formed fibrovascular tissue was located in the proximity of the AV loop. The AV loop is labeled with **bold arrows**. (A, C) ES spider silk; (B, D) WS spider silk.



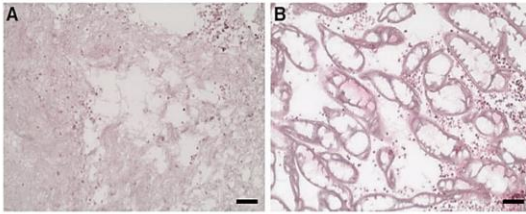


FIG. 6. Hematoxylin and eosin staining at 100-fold magnification (scale bar $\approx 50 \mu\text{m}$). The ES spider silk fibers (A) displayed a smaller diameter compared with that of the WS fibers (B).

ES constructs displayed more vessels (99.17 ± 52.37 vs. 29 ± 29.7) and a larger vessel area per cross-section ($0.12 \pm 0.07 \text{ mm}^2$ vs. $0.03 \pm 0.02 \text{ mm}^2$) compared with WS ones (Fig. 9).

The vessel number per cross-sectional area was 2.59 ± 1.43 vessels/ mm^2 for the ES group and 0.55 ± 0.38 per mm^2 for the WS group. Both groups displayed an incomplete vascularization of the construct area, with most vessels being restricted to a maximum distance from the AV loop of $0.45 \pm 0.14 \text{ mm}$ in the ES and $0.51 \pm 0.01 \text{ mm}$ in the WS group.

As previously mentioned, the newly formed and highly vascularized tissue was predominantly located around the AV loop. In contrast to the WS group, the vessel density per newly formed tissue was higher in the ES group (24.43 ± 16.86 vs. 6.73 ± 6.81 vessels/ mm^2).

Microcomputed tomography

Microcomputed tomography analysis confirmed the patency rate of 67% in the ES group and 25% in the WS group,

as detected by histology. The cumulative vessel length was calculated, and interestingly there was a trend toward a larger vessel network in the WS group ($477 \pm 586 \text{ mm}^2$ vs. $392.72 \pm 373.35 \text{ mm}^2$). Most of the newly formed vessels displayed a radius between 25 and $250 \mu\text{m}$ in the ES group and between 25 and $500 \mu\text{m}$ in the WS group (Fig. 10).

Discussion

Spider silk is a promising biomaterial for tissue engineering applications based on its unique mechanical and biological characteristics. Biotechnology allows the production of large amounts of spider silk proteins. Recombinant spider silk proteins and materials made thereof enable clinical applications since they display the required purity to serve as potential medical devices.

To generate suitable scaffolds for tissue engineering, initial vascularization is a highly challenging issue. Two main vascularization modes can be distinguished: The extrinsic mode describes the vessel ingrowth from the host organism into the construct, whereas the intrinsic mode

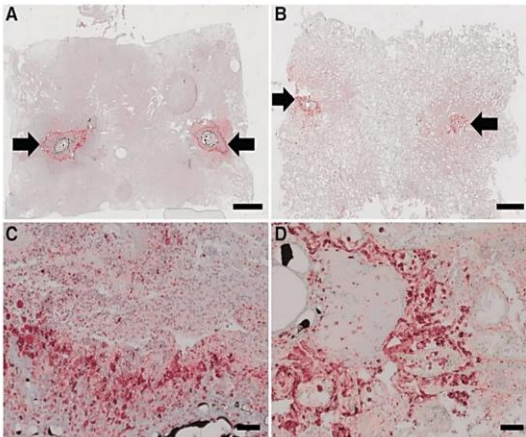
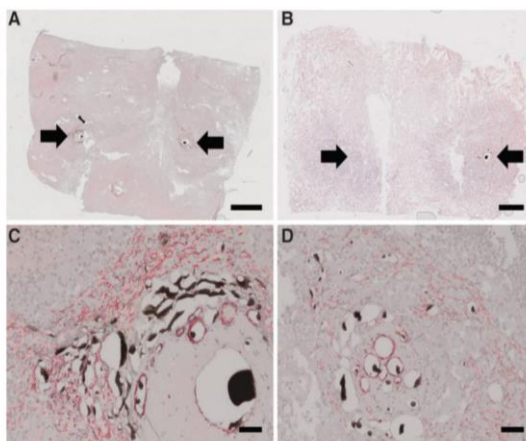


FIG. 7. ED1 immunostaining at 40- [(A, B) scale bar $\approx 1 \text{ mm}$] and 100-fold magnification [(C, D); scale bar $\approx 50 \mu\text{m}$]. Macrophages (red cells) were located in the interface between the newly formed connective tissue and the (non-) degraded spider silk fibers. No multinuclear giant cells could be detected. The AV loop is labeled with **bold arrows**. (A, C) ES spider silk fibers; (B, D) WS spider silk fibers.

FIG. 8. Immunohistological α -smooth muscle actin staining demonstrating the presence of smooth muscle cells inside the vessel walls (red). Images were made at 40- [(A, B) scale bar $\hat{=}$ 1 mm] and 100-fold magnification [(C, D); scale bar $\hat{=}$ 50 μ m]. The AV loop is labeled with **bold arrows**. (A, C) ES spider silk fibers; (B, D) WS spider silk fibers.



starts from a defined vascular pedicle, providing a strong tool to vascularize biomaterials. Using the AV loop fistula model, we were able to intrinsically vascularize different biomaterials such as soft (fibrin, hyaluronic acid) and hard tissue matrices (processed bovine cancellous bone, HA/ β -TCP, 45S5 bioactive glass).^{6-9,28}

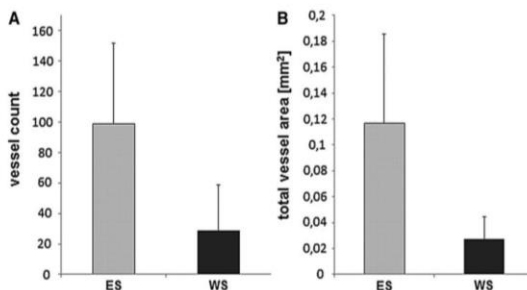
Here, Lewis rats received WS eADF4(C16) spider silk (WS) or ES eADF4(C16) spider silk (ES). After 4 weeks, partial vascularization of the constructs was detected with a tendency toward more vessels per cross-section in the ES group. Compared with previous AV loop studies, we were able to confirm a patency rate (67%) in the ES group.^{8,9,29-31} Manifold *in vivo* studies demonstrate a superior patency rate of silk-based small-diameter vascular grafts compared with common graft materials such as polytetrafluoroethylene or polyethylene terephthalate.³²⁻³⁴ The WS group displayed a

lower patency rate (25%), although silk fibroin has an antithrombotic surface, making it suitable for vascular tissue engineering applications.^{32,34}

The slightly higher thrombosis rate might be explained with the insufficient removal of HFIP of the thick WS fibers (44 μ m vs. 1.6 μ m) during processing, leading to a slow release of residual toxic solvent on implantation and/or could represent a technical failure during microsurgery.

Focusing on vascularization, we could demonstrate incipient vascularization of the spider silk matrices. In a previous study, Teflon isolation chambers were filled with fibrin, and vascularization was induced by means of an AV loop.³ After 4 weeks, 106.88 \pm 24.99 of newly formed vessels were observed per cross-section in the fibrin matrix. Comparing the newly formed vessels originating from the AV loop, the ES silk matrices equal the fibrin matrix.

FIG. 9. Automatic vascularization quantification. Constructs containing ES spider silk fibers displayed more vessels (A) and a larger vascularized area (B) per cross-section compared with that of the WS constructs.



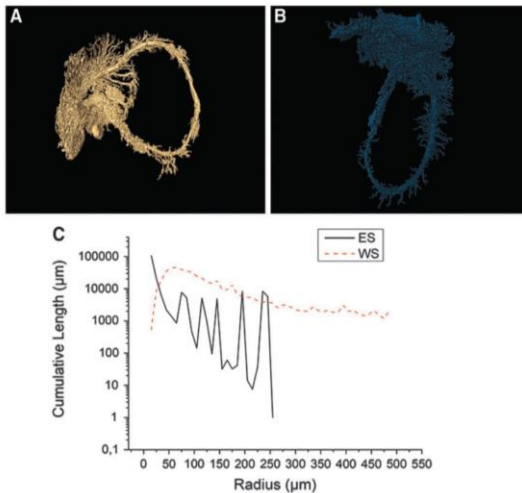


FIG. 10. μ CT reconstruction of ES (A) and WS constructs (B). Cumulative vessel length (C). The μ CT reconstructions revealed that the newly formed vascular network was close to the AV loop. The cumulative vessel length was larger in the WS group. μ CT, microcomputed tomography.

Vascularization of silk scaffolds was also examined by other groups. Han *et al.*³⁵ subcutaneously implanted silk scaffolds in Sprague–Dawley rats. The scaffolds, based on silk fibrin obtained from the silkworm *Bombyx mori*, were treated with either hydrochloric (HCl) acid or methanol (MeOH) before implantation. Extrinsic vascularization of the scaffolds could be shown after 4 weeks. Interestingly, in this study, more vessels were detected in the HCl and MeOH groups (66 ± 1 and 21.8 ± 3.6 per mm^2) than here in the ES or WS groups (2.59 ± 1.43 and 0.55 ± 0.38 per mm^2). Han *et al.* also demonstrated a faster tissue ingrowth (60–85%) compared with our study (8–11%).

An explanation for the observed results might be the larger dimension ($6 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ vs. $3 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$) of our constructs. Further, our AV loop study focused on the intrinsic vascularization and, consequently, tissue ingrowth originating from the AV loop; whereas using the extrinsic vascularization mode, as in the other study, tissue ingrowth was based on a larger surface area and thereby faster.³⁵

In another previous study, *B. mori* silk fibers were incorporated into poly-D,L-lactic acid (PDLLA) salt-leached scaffolds. The authors showed enhanced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation *in vitro* as well as extrinsic vascularization on subcutaneous implantation in Sprague–Dawley rats compared with plain PDLLA scaffolds, underlining the angiogenic potential of silk fibers.³⁶

Besides vascularization, biocompatibility is an important feature for tissue engineering applications. Here, the presence of macrophages was shown at the interface between the newly formed tissue and the spider silk matrices. Multinuclear giant cells, as a confirmation of a severe immunoreaction,

were absent, underlining the good biocompatibility of the eADF4(C16) spider silk matrices. Our findings are consistent with those of a previous study, demonstrating the reduction of foreign body reaction and capsule formation of eADF4(C16)-coated silicone implants versus non-coated ones.³⁷

Biodegradation is another important characteristic of biomaterials. Ideally, the scaffold should degrade at a rate simultaneous to *de novo* tissue formation.¹² The construct area can be interpreted as a surrogate parameter for biodegradation. With regard to the construct area of the WS and ES eADF4(C16) spider silk, we were able to detect a slower scaffold degradation compared with that of a fibrin gel after 4 weeks.³⁸ Interestingly, the ES matrices demonstrated a smaller construct area compared with the WS eADF4(C16) spider silk matrices, indicative of a slightly faster degradation probably due to the higher surface-to-volume area of the much thinner fibers.

Taking together, this pilot study demonstrates that engineered ADF4(C16) fibrous matrices are an interesting biomaterial for tissue engineering applications. Regarding vascularization, the pre-cultivation of silk scaffolds with cells before implantation (e.g., osteoblasts or endothelial cells) might enhance the vascularization of eADF4(C16) fibrous matrices.^{39–41} In this context, it is alluring to speculate that the use of pre-cultured eADF4(C16) scaffolds with the RGD-sequence might improve scaffold vascularization.²² The incorporation of angiogenic growth factors, such as bone morphogenetic protein (BMP)-2 or VEGF, represents another promising approach to stimulate angiogenesis and *de novo* tissue formation of silk scaffolds. Zhang *et al.* demonstrated that BMP-2 and/or VEGF doped silk scaffolds can promote mesenchymal stem cell homing

and differentiation, whereby angiogenesis as well as bone formation are stimulated in a critical-sized defect model.⁴²

Further, the use of a porous titanium chamber, combining the intrinsic as well as the extrinsic vascularization mode, might enhance vascularization and scaffold biodegradation.⁴³

Conclusion

In this study, we successfully achieved intrinsic vascularization of ADF4(C16) fibrous matrices in the rat AV loop model. Two different types of fibers were used, both demonstrating a good biocompatibility. The thinner fibers obtained by ES obviously allowed faster biodegradation and vascularization. Thereby, controlled spider silk processing opens up new possibilities to fine-tune vascularization of regenerated tissue on adjustment of the fiber diameters.

Acknowledgments

This study was funded by the ELAN-Fonds (14-08-22-1-Steiner) of the University of Erlangen-Nürnberg and Staedtler Foundation. The authors thank the Forschungstiftung Medizin at the University Hospital Erlangen and the Xue Hong and Hans-Georg Geis Foundation for ongoing support. Further, they acknowledge support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)—project number 326998133—TRR 225 (funded subprojects and PIs: A07: G.L.; C01: T.S.; C03: A.A.; C04: R.E.H.).

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Koob, S., Torio-Padron, N., Stark, G.B., Hannig, C., Stankovic, Z., and Finkenzeller, G. Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A* **17**, 311, 2011.
2. Strassburg, S., Nienhueser, H., Bjorn Stark, G., Finkenzeller, G., and Torio-Padron, N. Co-culture of adipose-derived stem cells and endothelial cells in fibrin induces angiogenesis and vasculogenesis in a chorioallantoic membrane model. *J Tissue Eng Regen Med* **10**, 496, 2016.
3. Arkudas, A., Prymachuk, G., Hoereth, T., et al. Dose-finding study of fibrin gel-immobilized vascular endothelial growth factor 165 and basic fibroblast growth factor in the arteriovenous loop rat model. *Tissue Eng Part A* **15**, 2501, 2009.
4. Erol, O.O., and Sira, M. New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Plast Reconstr Surg* **66**, 109, 1980.
5. Pribaz, J.J., Maiz, P.K., and Fine, N.A. Flap prefabrication using the "vascular crane" principle: an experimental study and clinical application. *Br J Plast Surg* **47**, 250, 1994.
6. Polykandriotis, E., Tjiaji, J., Euler, S., et al. The venous graft as an effector of early angiogenesis in a fibrin matrix. *Microvasc Res* **75**, 25, 2008.
7. Rath, S.N., Arkudas, A., Lam, C.X., et al. Development of a pre-vascularized 3D scaffold-hydrogel composite graft using an arterio-venous loop for tissue engineering applications. *J Biomater Appl* **27**, 277, 2012.
8. Arkudas, A., Balzer, A., Buehrer, G., et al. Evaluation of angiogenesis of bioactive glass in the arteriovenous loop model. *Tissue Eng Part C Methods* **19**, 479, 2013.
9. Buehrer, G., Balzer, A., Arnold, I., et al. Combination of BMP2 and MSCs significantly increases bone formation in the rat arterio-venous loop model. *Tissue Eng Part A* **21**, 96, 2015.
10. Arkudas, A., Beier, J.P., Heidner, K., et al. Axial pre-vascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng* **13**, 1549, 2007.
11. Arkudas, A., Beier, J.P., Prymachuk, G., et al. Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue Eng Part C Methods* **16**, 1503, 2010.
12. Guan, X., Avci-Adali, M., Alarcin, E., et al. Development of hydrogels for regenerative engineering. *Biotechnol J* **12**, [Epub ahead of print]; DOI: 10.1002/biot.201600394, 2017.
13. Yu, Q., Xu, S., Zhang, H., Gu, L., Xu, Y., and Ko, F. Structure-property relationship of regenerated spider silk protein nano/microfibrous scaffold fabricated by electrospinning. *J Biomed Mater Res A* **102**, 3828, 2014.
14. Meinel, L., Hofmann, S., Karageorgiou, V., et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials* **26**, 147, 2005.
15. Jao, D., Mou, X., and Hu, X. Tissue regeneration: a silk road. *J Funct Biomater* **7**, pii: E22, 2016.
16. Muller-Herrmann, S., and Scheibel, T. Enzymatic degradation of films, particles, and nonwoven meshes made of a recombinant spider silk protein. *ACS Biomater Sci Eng* **1**, 247, 2015.
17. Schacht, K., Vogt, J., and Scheibel, T. Foams made of engineered recombinant spider silk proteins as 3D scaffolds for cell growth. *ACS Biomater Sci Eng* **2**, 517, 2016.
18. Doblhofer, E., Heidebrecht, A., and Scheibel, T. To spin or not to spin: spider silk fibers and more. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 9361, 2015.
19. Lang, G., Neugirg, B.R., Kluge, D., Fery, A., and Scheibel, T. Mechanical testing of engineered spider silk filaments provides insights into molecular features on a mesoscale. *ACS Appl Mater Inter* **9**, 892, 2017.
20. Leal-Egana, A., Lang, G., Mauerer, C., et al. Interactions of fibroblasts with different morphologies made of an engineered spider silk protein. *Adv Eng Mater* **14**, B67, 2012.
21. Helfricht, N., Doblhofer, E., Duval, J.F.L., Scheibel, T., and Papastavrou, G. Colloidal properties of recombinant spider silk protein particles. *J Phys Chem C* **120**, 18015, 2016.
22. Wohlrab, S., Muller, S., Schmidt, A., et al. Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials* **33**, 6650, 2012.
23. DeSimone, E., Schacht, K., Pellert, A., and Scheibel, T. Recombinant spider silk-based bioinks. *Biofabrication* **9**, 044104, 2017.
24. Schacht, K., Jungst, T., Schweinlin, M., Ewald, A., Groll, J., and Scheibel, T. Biofabrication of cell-loaded 3D spider silk constructs. *Angew Chem Int Ed Engl* **54**, 2816, 2015.
25. Zepelin, P.H., Maksimovik, N.C., Jordan, M.C., et al. Spider silk coatings as a bioshield to reduce periprosthetic fibrous capsule formation. *Adv Funct Mater* **24**, 2658, 2014.
26. Huennerich, D., Scheibel, T., Vollrath, F., Cohen, S., Gat, U., and Ittah, S. Novel assembly properties of recombinant spider dragline silk proteins. *Curr Biol* **14**, 2070, 2004.

INTRINSIC VASCULARIZATION OF RECOMBINANT SPIDER SILK

1513

27. Vendrely, C., and Scheibel, T. Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromol Biosci* **7**, 401, 2007.
28. Kneser, U., Polykandriotis, E., Ohnolz, J., *et al.* Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue Eng* **12**, 1721, 2006.
29. Klumpp, D., Rudisile, M., Kuhnle, R.I., *et al.* Three-dimensional vascularization of electrospun PCL/collagen-blend nanofibrous scaffolds in vivo. *J Biomed Mater Res A* **100**, 2302, 2012.
30. Weis, C., Covi, J.M., Hilgert, J.G., *et al.* Automatic quantification of angiogenesis in 2D sections: a precise and timesaving approach. *J Microsc* **259**, 185, 2015.
31. Rath, S.N., Prymachuk, G., Bleiziffer, O.A., *et al.* Hyaluronan-based heparin-incorporated hydrogels for generation of axially vascularized bioartificial bone tissues: in vitro and in vivo evaluation in a PLDLLA-TCP-PCL-composite system. *J Mater Sci Mater Med* **22**, 1279, 2011.
32. Enomoto, S., Sumi, M., Kajimoto, K., *et al.* Long-term patency of small-diameter vascular graft made from fibroin, a silk-based biodegradable material. *J Vasc Surg* **51**, 155, 2010.
33. Zhang, J., Huang, H., Ju, R., *et al.* In vivo biocompatibility and hemocompatibility of a polytetrafluoroethylene small diameter vascular graft modified with sulfonated silk fibroin. *Am J Surg* **213**, 87, 2017.
34. Lovett, M., Eng, G., Kluge, J.A., Cannizzaro, C., Vunjak-Novakovic, G., and Kaplan, D.L. Tubular silk scaffolds for small diameter vascular grafts. *Organogenesis* **6**, 217, 2010.
35. Han, H., Ning, H., Liu, S., *et al.* Silk biomaterials with vascularization capacity. *Adv Funct Mater* **26**, 421, 2016.
36. Stoppato, M., Stevens, H.Y., Carletti, E., Migliaresi, C., Motta, A., and Guldberg, R.E. Effects of silk fibroin fiber incorporation on mechanical properties, endothelial cell colonization and vascularization of PDLA scaffolds. *Biomaterials* **34**, 4573, 2013.
37. Zeplin, P.H., Berninger, A.K., Maksimovikj, N.C., van Gelder, P., Scheibel, T., and Walles, H. [Improving the biocompatibility of silicone implants using spider silk coatings: immunohistochemical analysis of capsule formation]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* **46**, 336, 2014 (Article in German).
38. Arkudas, A., Tjiaw, J., Bleiziffer, O., *et al.* Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model. *Mol Med* **13**, 480, 2007.
39. Ghanaati, S., Unger, R.E., Webber, M.J., *et al.* Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials* **32**, 8150, 2011.
40. Unger, R.E., Ghanaati, S., Orth, C., *et al.* The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* **31**, 6959, 2010.
41. Fuchs, S., Motta, A., Migliaresi, C., and Kirkpatrick, C.J. Outgrowth endothelial cells isolated and expanded from human peripheral blood progenitor cells as a potential source of autologous cells for endothelialization of silk fibroin biomaterials. *Biomaterials* **27**, 5399, 2006.
42. Zhang, W., Zhu, C., Wu, Y., *et al.* VEGF and BMP-2 promote bone regeneration by facilitating bone marrow stem cell homing and differentiation. *Eur Cells Mater* **27**, 1, 2014.
43. Arkudas, A., Prymachuk, G., Beier, J.P., *et al.* Combination of extrinsic and intrinsic pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plast Reconstr Surg* **129**, 55e, 2012.

Address correspondence to

Dominik Steiner, MD

Department of Plastic and Hand Surgery

University Hospital of Erlangen

Friedrich-Alexander-University Erlangen-Nürnberg (FAU)

Krankenhausstr. 12

Erlangen D-91054

Germany

E-mail: dominik.steiner@uk-erlangen.de

Received: December 14, 2018

Accepted: February 25, 2019

Online Publication Date: April 25, 2019

4 Diskussion

AV-Loop-Operation

Die chirurgische Durchführung der AV-Loop-Operationen der eigenen und zweiten durchgeführten Arbeit orientierte sich an dem Protokoll von Weigand *et al.* (2016a) auf Grundlage der ersten Beschreibung des AV-Loop-Modells nach Erol und Spira (1979).

Nach der Implantation wurde den Ratten in der eigenen und zweiten durchgeführten Arbeit Enoxaparin (Clexane Multidose®) als antikoagulierende Therapie für zwei Tage verabreicht. Weigand *et al.* (2016a) beschrieben in den AV-Loop-Operationen im Rattenmodell seit 2007 ebenfalls eine kurzzeitige, postoperative Antikoagulation durch Heparin. Die eigene Arbeit erzielte eine Rate durchgängiger AV-Loops von insgesamt 84 %. In der zweiten Arbeit wurde in der Gruppe mit der nassgesponnenen Spinnenseide eine Durchgängigkeitsrate der AV-Loop-Gefäße von 25 % und in der Gruppe der elektrogewebten Spinnenseide von 67 % erreicht. Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lovett *et al.* (2010) die herausfanden, dass das Seidenfibroin bei der Implantation von Gefäßtransplantaten aus Spinnenseiden in die Bauchaorta von Ratten einen antithrombotischen Effekt erzielte. Arkudas *et al.* (2009b) beschrieben die gleiche zweitägige, postoperative

Antikoagulationstherapie wie in den beiden durchgeführten Arbeiten, erzielten jedoch eine Durchgängigkeitsrate von 90 %. Auch verabreichten Steiner *et al.* (2018) den Ratten im AV-Loop-Modell zwei Tage postoperativ Enoxaparin und erreichten in einer Gruppe mit ADA-GEL-Kapseln und MSCs eine Rate durchgängiger AV-Loops von 71 % und in einer zweiten Gruppe mit ausschließlich ADA-GEL Kapseln eine Rate von 62,5 %. Insgesamt beschrieben Weigand *et al.* (2016a), dass die Rate durchgängiger AV-Loops im Rattenmodell seit 2007 zwischen 80 % und 100 % lag, womit die Durchgängigkeitsrate der eigenen Studie innerhalb dieses Wertes liegt.

Die Ursachen einer Thrombose sind vielfältig und reichen von einer Infektion über eine Endothelläsion bis hin zu einer Immunreaktion oder Gefäßwandquetschung (McGavin & Zachary, 2009). Polykandriotis *et al.* (2011) beschrieben die Abhängigkeit einer erfolgreichen AV-Loop-Operation von den Erfahrungswerten und Fähigkeiten des Operateurs. In der Studie von Polykandriotis *et al.* (2011) wurde die Erfolgsrate von 612 AV-Loop-Operationen bei Lewis-Ratten ausgewertet und weniger ein Zusammenhang zwischen dem implantierten Biomaterial oder der Implantationsdauer festgestellt, sondern hauptsächlich zwischen der praktischen Übung und den mikrochirurgischen Fähigkeiten des Operateurs. Inwiefern sich

die Operateure der durch Polykandriotis *et al.* (2011) ausgewerteten AV-Loop-Operationen anhand ihrer Erfahrungswerte vom Operateur der zweiten durchgeführten Studie unterscheiden, kann hier jedoch nicht beurteilt werden.

Auswertung der Knochenbildung und Konstruktvascularisation

In beiden durchgeführten Arbeiten erfolgte eine Auswertung der Gewebeneubildung *ex vivo* nach der Explantation. Eine Beurteilung der Konstruktvascularisation konnte durch Gniesmer *et al.* (2019) im Femurkammermodell durch die Implantation einer Metallkammer mit Deckel jedoch auch *in vivo* erfolgen. Hierdurch wurde eine Beurteilung der mikrohämodynamischen Parameter auch während der Implantation möglich. Jedoch beschrieben Lehr *et al.* (1993) anhand des dorsalen Hautfaltenmodells im Laufe der Implantation eine Abnahme der Sichtbarkeit durch die Fenestrierung.

In der eigenen Arbeit und der zweiten durchgeführten Studie wurden die Kammern s.c. ohne eine Fenestrierung implantiert. Microfil® ist eine Perfusionslösung, die in den histologischen Schnittbildern im Gefäßlumen als schwarze Bereiche sichtbar blieb (Steiner *et al.* 2018). Die Perfusion konnte durch Steiner *et al.* (2018) mit einer Menge von 20 ml Microfil® unter Beimengung eines Härters von 0,6 ml durchgeführt werden. Die

gleichen Konzentrationen wurden in der zweiten durchgeführten Studie verwendet, wohingegen in der eigenen Arbeit der Härter in einer Menge von 1 ml verwendet wurde. Steiner *et al.* (2018) führten anschließend ein *ex vivo* μ CT durch. In der zweiten Arbeit erfolgte auch eine *ex vivo* μ CT-Analyse der Konstruktvascularisation.

Ehling *et al.* (2014) beschrieben eine *in vivo* μ CT-Darstellung in welcher die Tumorangio-genese in Mäusen analysiert werden konnte. Auch untersuchten Huehnerschulte *et al.* (2011) die Degeneration von Magnesiumlegierungen in Knochendefekten der Kanincentibia anhand eines *in vivo* μ CT-Scans. Für zukünftige AV-Loop-Studien stellt die *in vivo* μ CT-Analyse daher eine interessante Diagnostik für den Verlauf der Konstruktvascularisation und der Matrixdegeneration dar.

In der eigenen Arbeit konnten die Aufnahmen eines *ex vivo* μ CTs nach einer Entkalkung in EDTA nicht ausgewertet werden und wurden daher nicht in die Auswertung integriert. Buehrer *et al.* (2015) dekalzifizierten ebenfalls die explantierten Konstrukte aus HA/ β -TCP, Fibrin und MSCs in EDTA und konnten erfolgreich *ex vivo* μ CT-Aufnahmen anfertigen. Hierbei erfolgte die Dekalzifizierung durch Buehrer *et al.* (2015) für drei Wochen und die Dekalzifizierung in der eigenen Arbeit für bis zu 14 Wochen. Die Konstrukte der zweiten durchgeführten Studie wurden nicht dekalzifiziert.

Auch Arkudas *et al.* (2012) dekalzifizierten die Konstrukte aus HA/ β -TCP und Fibrin nach der Microfil® Perfusion für drei Wochen und fertigten erfolgreich *ex vivo* μ CT-Aufnahmen an. Eine Ursache für eine unzureichende Perfusion mit Microfil® konnten Weigand *et al.* (2015) bei einer porösen Titankammer im Vergleich zu einer Teflonkammer zeigen. Hierbei akkumulierte das Microfil® im Gewebe innerhalb der Teflonkammer, im Falle der Titankammer jedoch hauptsächlich in den Gefäßen außerhalb der Kammer, wodurch die Verwendung der Teflonkammer zu einer besseren μ CT-Darstellung führte.

Buehrer *et al.* (2015) konnten für die *ex vivo* μ CT-Darstellungen auch Konstrukte aus einer explantierten Titankammer verwenden, um die Konstruktvasikularisation darzustellen. Möglicherweise ist die Konzentration des Härters von 1 ml im Gegensatz zu den durch Buehrer *et al.* (2015) verwendeten 0,6 ml eine Ursache der nicht umsetzbaren μ CT-Analyse in der eigenen Arbeit.

Die μ CT-Analyse der zweiten durchgeführten Studie ergab eine höhere Gefäßlänge bei der nassgesponnenen eADF4(C16) Spinnenseide als bei der elektrogesponnenen eADF4(C16) Spinnenseide, welche jedoch nicht signifikant war. Die histologische Auswertung resultierte in einer höheren Gefäßzahl in der Gruppe der elektrogesponnenen Spinnenseide.

Laut Arkudas *et al.* (2010) ist eine alleinige histologische Analyse unzureichend, da sie nur Teilschnitte des Konstrukts abbildet und ein μ CT die Darstellung der gesamten Gefäßlänge ermöglicht, was die Divergenz der Ergebnisse der zweiten Studie erklären könnte. Das Microfil[®] stellte sich in den histologischen Schnittbildern beider durchgeführten Arbeiten im Gefäßlumen als schwarze Bereiche dar, was den Ergebnissen von Steiner *et al.* (2018) und Polykandriotis *et al.* (2007) entsprach.

Weis *et al.* (2015) nutzten diese schwarzen Bereiche für die Detektion der Gefäße mittels eines Algorithmus und ermöglichten somit eine automatische Quantifizierung der Konstruktvasikularisation. In der eigenen Arbeit und der zweiten vorliegenden Studie erfolgte die Auswertung der Gefäßanzahl und -verteilung auf der gleichen Grundlage wie in dem von Weis *et al.* (2015) entwickelten Algorithmus.

Die schwarzen Microfil[®] Bereiche im Gefäßlumen wurden in der eigenen Arbeit als „positive Ergebnisse“ mittels des Farberkennungstools in der Software Gnu Image Manipulation Program (GIMP) ausgewählt, durch das Tool von den umliegenden „negativen“, nicht schwarzen, Farbbereichen separat markiert und anschließend mit der Software ImageJ gezählt. Hierdurch konnten auch die Abstände der Gefäße gemessen werden. Durch die Erweiterungssoftware Fiji war

auch eine Stapelverarbeitung und dadurch Analyse mehrerer histologischer Schnittbilder zur gleichen Zeit möglich. Für die Auswertung der Knochenfläche konnte zusätzlich das Programm Paint3D in der eigenen Arbeit genutzt werden. Die Protokolle zur Analyse der Vaskularisation und der Knochenfläche wurden in der eigenen Arbeit neu etabliert. Nachteilig war jedoch, dass bei einer ungenügenden Füllung der Gefäßlumina mit dem Microfil® zum Teil eine manuelle Kennzeichnung der Gefäße notwendig war, was jedoch auch im von Weis *et al.* (2015) entwickelten Programm notwendig war. Beide neu etablierten Protokolle erzielten eine Zeitersparnis und objektivere Auswertung histologischer Schnittbilder, was auch durch das Programm von Weis *et al.* (2015) möglich war. Die Explantate beider durchgeführter Studien wurden in Paraffin eingebettet. In der eigenen Arbeit erfolgte eine vorherige Dekalzifizierung. Für die Detektion der Mineralisierung der Knochenmatrix beschrieben Goldschlager *et al.* (2010) eine Einbettung von Knochengewebe in das Harz Technovit ohne eine vorherige Dekalzifizierung. Jedoch war dieser Prozess im Gegensatz zu einer Paraffineinbettung irreversibel.

Durch eine von Kossa Färbung stellten Koob *et al.* (2011) die Mineralisierung einer Knochenmatrix im histologischen Schnittbild schwarz dar. Hierbei wurden die Ca-Salze in der

Knochenmatrix, wie in der Studie von Wang *et al.* (2006) beschrieben, schwarz dargestellt. Dies war in der eigenen Arbeit durch eine vorherige Dekalzifizierung nicht mehr möglich, stellt jedoch eine interessante histologische Färbung für nachfolgende Studien dar.

In den beiden durchgeführten Arbeiten erfolgte eine HE-Färbung, welche das neu gebildete fibrovaskuläre Gewebe sowie das Knochengewebe darstellte. Die HE-Färbung ist eine Standardfärbung welche die Zellkerne blau, das Zytoplasma blassrosa und Knochengewebe rot dargestellt (Sinowatz & Rodler, 2019), was mit der Darstellung in den eigenen durchgeführten Studien übereinstimmte.

Auch wurde eine Trichromfärbung nach Masson-Goldner in beiden Studien durchgeführt. Diese stellte das Gewebe entsprechend der Beschreibung durch Sinowatz & Rodler (2019) dar und die Knochenmatrix in der eigenen Arbeit ließ sich lichtgrün darstellen, entsprechend der Beschreibung durch Lang *et al.* (2012).

Die alpha-Smooth-Muscle-Actin Färbung stellte in den histologischen Schnitten von Steiner *et al.* (2018) die glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden dar, was mit den Ergebnissen der eigenen und der zweiten durchgeführten Arbeit übereinstimmte.

Die Biokompatibilität der implantierten Biomaterialien

In der eigenen Arbeit wurden humane ADSCs und HUVECs in Ratten implantiert. Hierbei wurden RNU-Ratten verwendet. Die RNU-Ratten besaßen eine Mutation des FOXP1 Gens und eine kongenitale Aplasie des Thymus. Romano *et al.* (2013) beschrieben, dass diese Mutation aufgrund des Ausbleibens der embryonalen Thymusentwicklung zu einer schweren T-Zell-Immundefizienz führte, da FOXP1 der Hauptregulator für die Entwicklung des Thymusepithels ist.

Nach Souza-Offtermatt *et al.* (2004) sind T-Zellen hauptsächlich an einer Abstoßungsreaktion nach einer Transplantation von Organen beteiligt. Die Abstoßungsreaktion erfolgt sobald transplantierte Organe oder Gewebe von genetisch differenten Spendern und Empfängern stammen (Souza-Offtermatt *et al.* 2004). Die genetische Differenz besteht in der eigenen Arbeit zwischen den implantierten, humanen Zellen und den Empfängerratten.

Arkudas *et al.* (2007a) verwendeten für die Implantation von Osteoblasten aus Spenderratten und einer Matrix aus Rinderknochen im AV-Loop-Modell Lewis-Ratten als Empfängerratten. Lewis-Ratten sind in den 1950er Jahre gezüchtete Albinoratten und zählen zu den häufig verwendeten Versuchsratten (Modlinska & Pisula, 2020). Nach vier und acht Wochen Implantationszeit zeigte sich in der Histologie eine

deutliche Immunreaktion der Empfängerratten mit dem Vorhandensein von mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen (Arkudas *et al.* 2007a). Das Vorhandensein beider Zellarten lässt auf eine starke Immunreaktion auf das implantierte Biomaterial schließen (Noli *et al.* 2014). Mehrkernige Riesenzellen entwickeln sich bei einer Reaktion auf einen Fremdkörper aus Makrophagen. Sie stimulieren über eine Antigenpräsentation Lymphozyten für eine spezifische Immunantwort (Noli *et al.* 2014).

Koob *et al.* (2011) verwendeten im Gegensatz zu Arkudas *et al.* (2007a) immundefiziente Mäuse für die Implantation von humanen MSCs und HUVECs in einen Defekt des Schädelknochens. Obwohl die Mäuse zusätzlich zum T-Zell-Defekt einen B-Zell-Defekt auswiesen wurde aufgrund der Immundefizienz keine negative Beeinträchtigung der Knochenbildung festgestellt.

Liu *et al.* (2017a) verwendeten Nacktratten mit einer FOXP1-Genmutation, um humane MSCs und HUVECs in einen Schädeldefekt zu implantieren. Das Ergebnis konnte zeigen, dass die Zellimplantation zu einer Steigerung der Knochenbildung führte, was den Ergebnissen der eigenen Studie nach einer Verwendung von RNU-Ratten mit einer FOXP1-Genmutation entsprach. Jedoch fehlte in der Studie von Liu *et al.* (2017a) ebenso wie in der eigenen Arbeit eine

histologische Färbung zur Detektion vorhandener Makrophagen oder mehrkerniger Riesenzellen, beispielsweise durch eine ED1 Färbung (Steiner *et al.* 2018).

In der zweiten durchgeführten Studie wurde eine ED1 Färbung durchgeführt, welche die Anwesenheit von Makrophagen im neu gebildeten Bindegewebe und der implantierten Spinnenseidenmatrix eADF4(C16) nach einer vierwöchigen Implantation in Lewis-Ratten aufzeigte. Jedoch ohne einen Nachweis mehrkerniger Riesenzellen. Für den Nachweis einer Fremdkörperreaktion ist nicht nur das Vorhandensein von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und Leukozyten entscheidend sondern auch eine klinische Symptomatik. Souza-Offtermatt *et al.* (2004) beschreiben hierbei ein akutes Auftreten von Fieber, Schwellung, Schmerzen und Funktionsverlust welche innerhalb von vier bis fünf Tagen nach der Operation auftreten, sich aber auch verzögert nach bis zu drei Monaten zeigen können.

In der eigenen Studie konnten bis zum Zeitpunkt der Explantation nach sechs Wochen keine Zeichen einer Abstoßungsreaktion detektiert werden, was mit den Ergebnissen nach einer Implantation von HA und Fibrin durch Buehrer *et al.* (2015) übereinstimmte.

In der zweiten Studie traten bei zwei Ratten der nassgesponnenen Spinnenseide Wundheilungsstörungen und

eine Konstruktverschiebung auf, welche jedoch von der Auswertung exkludiert wurden und daher kein Zusammenhang zwischen der klinischen Symptomatik und der Implantation der Spinnenseidenmatrix festgestellt werden konnte. Die restlichen Ratten zeigten keine klinische Symptomatik und tolerierten die AV-Loop-Operation gut. Bei der Implantation einer Spinnenseidenmatrix mit dem Protein 4RepCT stellten Fredriksson *et al.* (2009) nach einer Woche Implantation in das Rückenammermodell der Ratte Erytheme bei fünf Konstrukten fest. Die Vergleichbarkeit mit der zweiten Studie ist jedoch aufgrund der kurzen Implantationszeit von nur einer Woche (Fredriksson *et al.* 2019) und der verschiedenen Spinnenseidenproteine begrenzt.

Zeplin *et al.* (2014) beschichteten Silikonimplantate mit eADF4(C16) Spinnenseide und konnten nach drei, sechs und zwölfmonatiger Implantation in das Rückenhautkammermodell der Ratte auch langfristig eine gute Biokompatibilität der Spinnenseide, aufgrund der Abwesenheit von Entzündungszeichen oder eine Fibrose, nachweisen.

Die Korrelation zwischen der Biodegeneration der Materialien und der Gewebeneubildung

In der eigenen Arbeit wurde das Biomaterial Fibrin mit und ohne eine Applikation von Zellen in Kombination mit Granulen

aus HA implantiert. Das HA ist als Biokeramik aufgrund seiner osteokonduktiven Eigenschaften für eine Implantation im Knochen Tissue Engineering geeignet, konnte jedoch nur geringfügig abgebaut werden (Holmes *et al.* 1987).

Nach der Implantation von HA in einen Radiusdefekt von Hunden zeigten Holmes *et al.* (1987), dass auch nach 48 Monaten keine Anzeichen einer Degeneration des HA Konstruktes zu verzeichnen waren. Jedoch fand eine Knochenbildung, bezogen auf die Konstruktfäche, von bis zu 73 % statt.

Auch Buehrer *et al.* (2015) konnten weder nach sechs, noch nach 12 Wochen Anzeichen einer Biodegeneration der implantierten HA-Matrix detektieren. Auch Weigand *et al.* (2015) zeigten, dass die Implantation des kommerziell verfügbaren NanoBones® in das AV-Loop-Modell des Schafes nach 18 Wochen nur eine Degeneration von 80 % erreichte. Diese Ergebnisse decken sich mit dem Ergebnis der eigenen Arbeit, in welcher sich nach sechs Wochen nur an den äußeren Randbereichen der HA-Granulen Anzeichen einer Degeneration zeigten. Für die Fibrinmatrix ist bezogen auf eine Biodegeneration die Fibrinogen- und Thrombinkonzentration von Bedeutung, da sich Konzentrationen von 33,7 mg/ml Fibrinogen und 25 I.U. /ml Thrombin negativ auf die Konstruktvascularisation ausgewirkt haben (Polykandriotis *et*

al. 2008). Arkudas *et al.* (2007b) verwendeten daher Konzentrationen von 10 mg/ml Fibrinogen und 2 I.U. /ml Thrombin. Außerdem wurde Aprotinin als Proteaseinhibitor in einer Konzentration von 1500 K.I.U. /ml hinzugefügt, um die Fibrinolyse zu verzögern. Durch eine Verwendung der Matrix mit den Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF wurde eine Konstruktschrumpfung zusätzlich beschleunigt und es kam bereits nach zwei und vier Wochen zu einer Fibrinolyse. Diese Konzentrationen wurden ebenfalls in der eigenen Arbeit verwendet, mit dem Ergebnis einer vollständigen Fibrinolyse und Geweberegeneration nach einer Implantationszeit von sechs Wochen.

Arkudas *et al.* (2009b) implantierten eine Gruppe mit 40 mg/ml Fibrinogen im Vergleich zu einer Gruppe mit 10 mg/ml Fibrinogen, konnten jedoch keinen Einfluss der Konzentration auf die Degeneration verzeichnen, da das Fibrin nach wie vor nach zwei Wochen nahezu vollständig abgebaut war. Jedoch stellten Arkudas *et al.* (2009b) fest, dass eine Verdünnung des Fibrinogens durch eine bessere Formgebung der koagulierten Matrix besser zu handhaben war, was mit den Erfahrungswerten über die Matriximplantation der eigenen Arbeit übereinstimmt. Bühner *et al.* (2015) verwendeten Fibrinogen in einer Konzentration von 10 mg/ml und 2 I.U. /ml Thrombin, was sich mit den Materialkonzentrationen der eigenen Arbeit deckt. Eine

vollständige Degeneration sowie einen Ersatz der Fibrinmatrix durch fibrovaskuläres Gewebe konnten sowohl bei Bühner *et al.* (2015), als auch in der eigenen Arbeit nach sechs Wochen nachgewiesen werden. Die implantierten Spinnenseiden der zweiten Studie wurden nur zu einem Teil nach vier Wochen abgebaut. Zeplin *et al.* (2014) konnten nachweisen, dass die rekombinant hergestellten Spinnenseidenproteine eADF4(C16) auch nach 12 Monaten noch auf den implantierten Silikonimplantaten nachweisbar waren. In der zweiten Arbeit wurden in den Randbereichen der histologischen Schnittbilder innerhalb der Spinnenseidenfasern keine Zellen oder Gefäße nachgewiesen.

Johansson *et al.* (2019) modifizierten die 4RepCT Spinnenseide mit Fibronectin, was zu einer verbesserten Zelladhäsion und Zellverteilung innerhalb der Faserbündel führte. Auch wurde eine Modifikation der eADF4(C16) Spinnenseide mit RGD-Sequenzen beschrieben, was die Adhäsionskapazität der Seide deutlich verbesserte (Salehi *et al.* 2020 zitiert nach Widhe *et al.* 2013).

Auch bei einem Schaum aus eADF4(C16) Spinnenseide konnte durch die Kombination mit einer RGD-Sequenz die Zelladhäsion und -verteilung *in vitro* gesteigert werden (Salehi *et al.* 2020 zitiert nach Schacht *et al.* 2016). Der Zusammenhang der Vaskularisation und Gewebeneubildung mit einer

Modifikation der eADF4(C16) Spinnenseidenmatrix könnte ein Bestandteil zukünftiger AV-Loop-Studien werden, um eine Konstruktvasikularisation zu verbessern.

Integration in das umliegende Gewebe

In der eigenen Arbeit wurde eine poröse Titankammer implantiert, welche eine direkte Verbindung zwischen dem umliegenden Gewebe und dem implantierten Biomaterial ermöglichte. Dies zeigte sich dadurch, dass das Gefäßnetzwerk im histologischen Schnittbild die gesamten Konstrukte bis in die Randbereiche durchzog und die Kammern makroskopisch in das umliegende Gewebe eingewachsen waren.

Buehrer *et al.* (2015) zeigten, dass durch die Verwendung der porösen Titankammer im AV-Loop-Modell eine Verbindung zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Gefäßnetzwerk ermöglicht wurde. Im Gegensatz dazu stand die Implantation der Kammer aus Teflon® in der zweiten Studie, in welcher die Vaskularisation auf die zentralen Konstruktbereiche begrenzt war. Im direkten Vergleich zwischen einer Titan- und Teflonkammer zeigten Weigand *et al.* (2015), dass die poröse Titankammer zu einer besseren Degeneration des implantierten Biomaterials führte als die Teflonkammer. Dies wurde mit der verbesserten Zellmigration aus dem umliegenden Gewebe durch die Poren der

Titankammer begründet. Eine Implantation der HA-Granulen, welche im Konstrukt von der Fibrinmatrix umgeben waren, führte in der eigenen Arbeit zu einer Gewebeneubildung zwischen den Graulen. Dies entsprach den Ergebnissen von Holmes *et al.* (1987) die zeigen konnten, dass eine Implantation von porösem HA ein Einwachsen von Gewebe in die poröse Struktur begünstigte und letztendlich in einer Knochenbildung resultierte.

Ito *et al.* (2008) zeigten, dass die Verwendung von interporösem HA, als Zellträger für Chondrozyten, nach 12 Wochen in der Patellarrinne des Kaninchens zu einer Knochenbildung führte. Auch Kim *et al.* (2015) stellten eine verbesserte Knochenneubildung durch einen zentralen Bohrgang in einem HA-/Aluminiumoxid-Konstrukt, nach einer Implantation in einen Knochendefekt der Tibia von Hunden, fest.

Der Erhalt der Zellvitalität von ADSCs und HUVECs in der Fibrin-/HA-Matrix

Um in der eigenen Arbeit den Nachweis zu erbringen, dass die ADSCs und HUVECs nach der sechswöchigen Implantation noch in den Konstrukten vorhanden waren erfolgte eine Zelldetektion mittels spezifischer Antikörper in der Immunfluoreszenz. Die HUVECs wurden mit dem humanen CD31 Antikörper gefärbt und konnten in den explantierten

Konstrukten nachgewiesen werden. Eine Detektion von HUVECs in einer *in vitro* Kultivierung auf einer Ca-Phosphat-Zement-Matrix konnten auch Liu *et al.* (2017a) erfolgreich durchführen. Da die in der eigenen Studie implantierten ADSCs vor der Implantation mittels FACS-Analyse zu $99,70 \pm 0,1$ % positiv auf den Oberflächenmarker CD105 getestet wurden, erfolgte nach der Explantation eine Immunfluoreszenz-Färbung mittels des humanen Antikörpers CD105, welcher die ADSCs in den Konstrukten markieren konnte. Auch Yamamoto *et al.* (2007) detektierten ADSCs von Mäusen durch den murinen Antikörper CD105 in der Immunfluoreszenz. Da das Zellüberleben über eine Sauerstoff- und Nährstoffversorgung per Diffusion nur über eine Distanz von etwa 150 – 200 μm sichergestellt werden kann (Folkman & Hochberg, 1973), konnten Arkudas *et al.* (2007a) zeigen, dass eine Implantation von Osteoblasten in das AV-Loop-Modell das Zellüberleben im Gegensatz zu einer Implantation ohne die chirurgische Angiogenese förderte (Steiner *et al.* 2018). Dies spricht für das Ergebnis der eigenen Arbeit, dass nach einer sechswöchigen Implantation im AV-Loop-Modell ADSCs und HUVECs in den Konstrukten nachgewiesen werden konnten.

Auch zeigten Ausländer *et al.* (2012), dass Hydrogele für Nährstoffe und Sauerstoff durchlässig waren und Wilson *et al.* (2014), dass Hydrogele eine Schutzschicht vor mechanischen

Stressoren bildeten. Das Zellüberleben nach sechs Wochen spricht daher zusätzlich für das in der eigenen Studie verwendete Fibrin als Zellträger.

Die Konstruktvascularisation

Neben der Verwendung von prävascularisierten Konstrukten (Liu *et al.* 2017a) konnte auch eine chirurgisch induzierte Angiogenese zu einer Konstruktvascularisation führen (Tanaka *et al.* 2003). In der eigenen Studie und der zweiten Publikation wurde das AV-Loop-Modell durchgeführt, welches durch Erol und Spira 1979 entwickelt wurde. Sie fanden heraus, dass eine Gefäßschleife zu einer gesteigerten Vascularisation eines transplantierten Hautlappens führte.

Tanaka *et al.* (2003) verglichen dieses Modell mit dem AV-Bundle-Modell, bei welchem eine Ligatur der Gefäße ohne die Transplantation eines Veneninterponates erfolgte. Hierbei wurde festgestellt, dass das AV-Loop-Modell im Vergleich zu einer signifikant erhöhten Gewebeneubildung, einem deutlich gesteigerten Blutfluss sowie effizienterer Gefäßneubildung führte. Die Ratten der eigenen Studie zeigten nach der AV-Loop-Operation keine klinische Symptomatik wie Wundheilungsstörungen, Dysfunktionalität, Hämatome oder Nahtdehiszenzen, was mit dem Ergebnis von Buehrer *et al.* (2015) und Arkudas *et al.* (2009b) nach der Implantation einer

Fibrinmatrix übereinstimmte. Das AV-Loop-Modell hat bereits in mehreren Studien zu einer gesteigerten Konstruktvascularisation beigetragen (Weigand *et al.* 2015; Polykandriotis *et al.* 2008; Arkudas *et al.* 2010). In der eigenen Studie wurde eine Vascularisation der Fibrin-/HA-Matrix erreicht, welche eine Gefäßverteilung über die gesamte Konstruktfläche aufwies.

Van Hinsbergh *et al.* (2001) konnten zeigen, dass eine Fibrinmatrix selbst einen Einfluss auf die Angiogenese hatte. Dies könnte zum Ergebnis der eigenen Arbeit beigetragen haben, dass eine Implantation der Fibrinmatrix ohne Zellen keine Verringerung der Gefäßanzahl nach sich zog.

Auch Polykandriotis *et al.* (2008) konnten nach 10-14 Tagen die Neoangiogenese einer Fibrinmatrix ohne eine Zellimplantation im AV-Loop-Modell zeigen. Entgegen dem Ergebnis von Liu *et al.* (2017a) führte die Implantation von HUVECs und MSCs (in der eigenen Arbeit ADSCs) als Kokultur zu keiner vermehrten Konstruktvascularisation in der eigenen Arbeit. Die implantierten eADF4(C16) Spinnenseiden führten zu einer Konstruktvascularisation nach vier Wochen, jedoch war die Verteilung der Gefäße auf die zentralen Bereiche begrenzt. Weigand *et al.* (2015) beschrieben, dass die Implantation einer Teflonkammer im Gegensatz zu einer porösen Titankammer, nicht zu einem Einwachsen des

umliegenden Gewebes in die implantierten Konstrukte führte, was in der zweiten durchgeführten Arbeit ebenfalls der Fall war.

Steiner *et al.* (2018) implantierten eine Teflonkammer mit ADA-GEL Kapseln, welche im Verhältnis zu Fibrin (Arkudas *et al.* 2007b) langsamer abgebaut wurden und fanden nach vier Wochen heraus, dass die Neoangiogenese zentral um den AV-Loop lokalisiert war. Auch die eADF4(C16) Spinnenseidenmatrizes waren in der zweiten durchgeführten Studie nach einer Implantationszeit von vier Wochen noch großflächig nachzuweisen, wohingegen die Gefäße und Zellen innerhalb der Konstrukte zentral lokalisiert waren.

Die Konstruktfläche der elektrogesponnenen Spinnenseiden Präparate war geringgradig kleiner was womöglich mit einer geringgradig schnelleren Degeneration der dünneren, elektrogesponnenen Fasern einherging. Auch Steiner *et al.* (2018) beschrieben eine größere Konstruktfläche der langsam degenerierenden ADA-GEL Kapseln im Gegensatz zum schnell degenerierenden Fibrin aus der Studie von Arkudas *et al.* (2007b).

Steiner *et al.* (2018) bestätigten die Aussage von Glass *et al.* (2016), dass ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen der Geweberegeneration und der Biodegeneration bestand. Auch in der zweiten Studie waren die eADF4(C16)

Spinnenseidenmatrizes nach vier Wochen nicht vollständig degeneriert und konnten im Gegensatz zu einer Fibrinolyse (Arkudas *et al.* 2007b) zu keinem vollständigen Ersatz der Matrizes durch fibrovaskuläres Gewebe führen.

Der Einfluss der Implantation von ADSCs und HUVECs auf die Knochenbildung

In der eigenen Arbeit wurden ADSCs aus dem humanen Fettgewebe isoliert und in einem Zellkulturmedium für zwei Wochen *in vitro* osteogen prädifferentiiert. Die Ergebnisse von Mutschall *et al.* (2020) zeigten, dass ADSCs aus dem Fettgewebe humaner Spender ein osteogenes Potenzial aufwiesen. Durch die Hochregulation der AP und einer Matrixmineralisierung in der osteogen prädifferentiierten Zellkultur in der eigenen Studie, konnte dieses Potenzial gezeigt werden. Durch eine FACS-Analyse konnten die ADSCs in der eigenen Arbeit positiv auf die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 getestet werden, was den Merkmalen von MSCs laut Dominici *et al.* (2006) entsprach. Im Gegensatz zu MSCs aus dem Knochenmark zeigten die Ergebnisse von Noël *et al.* (2008) *in vitro* ein geringeres osteogenes Potenzial der ADSCs. Dennoch überzeugte die leichtere Gewinnung der ADSCs im Gegensatz zur Isolation der MSCs aus dem Knochenmark (Noël *et al.* 2008). Lin *et al.* (2010) gaben an, dass aus einem Gramm

Fettgewebe bis zu 5000 ADSCs gewonnen werden konnten, aus einem Milliliter Knochenmark jedoch nur 100-1000 MSCs. Auch in der eigenen Arbeit konnten pro Isolation aus dem subkutanen Fettgewebe zwischen 5×10^6 und 30×10^6 ADSCs gewonnen werden (nicht veröffentlichte Daten), je nach Menge des Spendergewebes.

Die ADSCs als Monokultur führten nach einer Implantation mit Fibrin und HA in der eigenen Arbeit zu einer Knochenbildung, was sich mit den Ergebnissen von Streckbein *et al.* (2013) deckte, dass humane ADSCs in einer Fibrinmatrix zu einer Knochenbildung mit Defektüberbrückung im Kaninchenunterkiefer führten. In der eigenen Arbeit wurden zusätzlich zu ADSCs auch HUVECs verwendet, welche sowohl als Mono- als auch als Kokultur mit den ADSCs in der Fibrin-/HA-Matrix implantiert wurden.

Rouwkema *et al.* (2006) zeigten *in vitro*, dass eine Kokultivierung von HUVECs und MSCs zu einer Hochregulation der AP und somit der osteogenen Differenzierung der MSCs führte. Dieses Ergebnis konnten Wang *et al.* (2011) und Mutschall *et al.* (2020) bei einer Kokultivierung von ADSCs mit HUVECs erzielen. Eine Kokultivierung im Verhältnis von 50 % HUVECs und 50 % ADSCs führte zu einer signifikanten Steigerung des angiogenen und osteogenen Potenzials der Zellen (Mutschall *et al.* 2020).

Dieses Ergebnis konnte auch in der eigenen Arbeit gezeigt werden. Eine Implantation von HUVECs und ADSCs in einem Verhältnis von 1:1 führte in der eigenen Arbeit zu einer signifikanten Steigerung der Knochenbildung im Gegensatz zu einer Implantation der ADSCs oder HUVECs als Monokultur. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu einer Studie von Cornejo *et al.* (2012), in welcher eine Implantation von endothelial und osteogen differenzierten ADSCs im Verhältnis von 1:1 zu keiner signifikanten Steigerung der Knochenbildung führte, im Vergleich zu einem Knochenallotransplantat in einen Schädeldefekt der Ratte. Cornejo *et al.* (2012) verwendeten hierbei jedoch endothelial differenzierte ADSCs im Gegensatz zu den HUVECs in der eigenen Arbeit. Darüber hinaus birgt eine allogene Knochentransplantation das Risiko einer Transplantatabstoßung oder Entnahmemorbidität (Banwart *et al.* 1995; Keating *et al.* 2005), weshalb in der eigenen Studie eine Fibrin-/HA-Matrix verwendet wurde.

Eine *in vivo* Implantation von HUVECs mit humanen MSCs auf einer Ca-Phosphat-Zement-Matrix konnte im Schädeldefekt der Ratte durch Liu *et al.* (2017a) zu einer gesteigerten Knochenbildung führen. Das widerspricht den Ergebnissen von Koob *et al.* (2011), welche durch eine Koimplantation von HUVECs und humanen MSCs keine weitere Steigerung der Knochenbildung in einem Schädeldefekt erzielen konnten. Der

Unterschied zu Cornejo *et al.* (2012) und Koob *et al.* (2011) war jedoch, dass Liu *et al.* (2017a) die Matrix 21 Tage vor der Implantation mit HUVECs und MSCs prävasikularisieren ließen. Die zellhaltigen, prävasikularisierten Konstrukte führten zu einer signifikanten Steigerung der Knochenbildung im Gegensatz zu der gleichen, nicht prävasikularisierten Matrix. Eine Prävasikularisation der Konstrukte fand in der eigenen Arbeit nicht statt, jedoch wurde die chirurgisch induzierte Angiogenese mittels des AV-Loop-Modells durchgeführt. Das neu gebildete Knochengewebe war in der eigenen Studie im Zentrum der Konstrukte lokalisiert, was mit den Ergebnissen von Buehrer *et al.* (2015) übereinstimmte, welche hauptsächlich eine um den AV-Loop lokalisierte Knochenbildung nach einer Implantation von Fibrin, HA/ β -TCP mit MSCs und BMP-2 feststellen konnten.

Jedoch verwendeten Buehrer *et al.* (2015), im Gegensatz zur eigenen Arbeit, MSCs und den Wachstumsfaktor BMP-2, welcher in humanen, klinischen Fallstudien bei einer Implantation im Halswirbelbereich vermehrt zu postoperativen Komplikationen wie Wunddehiszenzen (Cahill *et al.* 2009), Hämatomen und Entzündungen geführt hatte (Shields *et al.* 2006; Tannoury & An, 2014). Die Knochenfläche in der eigenen Studie lag in der Kokulturgruppe nach sechs Wochen bei maximal $1,88 \pm 0,43 \text{ mm}^2$ und nach einer Implantation von

BMP-2 bei Buehrer *et al.* (2015) nach sechs Wochen bereits bei $9.18 \pm 5.3 \text{ mm}^2$. Jedoch war die gebildete Knochenfläche durch die Implantation der Monokultur an ADSCs in der eigenen Arbeit ($1,06 \pm 0,62 \text{ mm}^2$) höher als die Knochenfläche durch eine Implantation der Monokultur MSCs ($0,03 \pm 0,09 \text{ mm}^2$) durch Buehrer *et al.* (2015). Eine weitere Steigerung der Knochenbildung konnte in einem Zeitraum von bis zu 12 Wochen durch Buehrer *et al.* (2015) erzielt werden, was eine längere Implantationsdauer zur Steigerung der Knochenfläche in der eigenen Studie zu einer möglichen Option zukünftiger Studien werden lässt.

Auch Weigand *et al.* (2015) stellten nur in der Hälfte der implantierten Konstrukte aus HA/ β -TCP nach sechs Wochen eine Gewebeneubildung fest, wohingegen es nach 18 Wochen zu einer deutlichen Steigerung der Knochenbildung in den Konstrukten im AV-Loop-Modell des Schafes kam. Auch eine ausschließliche Implantation von HA in einen Radiusdefekt von Hunden durch Holmes *et al.* (1987) führte zu einer Knochenbildung von 73 %, jedoch erst nach bis zu 48 Monaten. Interessanterweise wurde durch eine Implantation von HUVECs als Monokultur in der eigenen Arbeit auch Knochengewebe gebildet. Dies könnte mit der Fähigkeit von Endothelzellen zusammenhängen osteogene Stammzellen zu stimulieren (Lampert *et al.* 2016; Villars *et al.* 2002). Da die

Poren der Titankammer in der Studie von Weigand *et al.* (2015) die Zellmigration aus dem umliegenden Gewebe begünstigten, wäre eine Stimulation der Osteoprogenitorzellen der Ratten in der eigenen Arbeit eine mögliche Erklärung für die Knochenbildung nach einer HUVEC-Implantation. Ohne die Implantation von ADSCs und HUVECs konnte in der eigenen Arbeit keine Knochenbildung detektiert werden.

Auch Arkudas *et al.* (2010) konnten nach einer Implantation von Fibrin, HA und β -TCP im AV-Loop-Modell ohne MSCs keine Knochenbildung beobachten, was einen Zusammenhang zwischen der Knochenbildung und der Zellimplantation in einer Matrix aus Fibrin und HA oder Fibrin und β -TCP im AV-Loop-Modell herstellt.

Zusammenfassend stellen beide durchgeführten Arbeiten einen neuen Ansatz in der Etablierung eines klinisch einsetzbaren Biomateriales für das Knochen Tissue Engineering dar. Mit der Applizierung von HUVECs und osteogen prädifferentiierten ADSCs war die Bildung vaskularisierten Knochengewebes im Rattenmodell möglich. Auch der individuelle Heilversuch am Menschen durch Horch *et al.* (2014) vereinte die Implantation von unter anderem osteokonduktivem HA, autologen Stammzellen aus dem Knochenmarkspunktat, einer chirurgischen Anastomose und dem der Extrazellulärmatrix ähnlichen Hydrogel Fibrin. Daher ist auch unter moralischer

Betrachtung eine Verwendung von humanen Stammzellen im Tierversuchsmodell ein Versuchsdesign, welches sich näher an der humanmedizinischen Klinik orientiert. Auch sollte eine *in vitro* Evaluation der zu implantierenden Biomaterialien und Zellen vor einer *in vivo* Implantation im Tierversuchsmodell erfolgen. Inwieweit sich tierartspezifische ADSCs und HUVECs in ihren Eigenschaften unterscheiden und therapeutisch auch im veterinärmedizinischen Bereich Anwendung finden können, unterliegt bisher noch der Durchführung zukünftiger Studien, entsprechend der Umsetzbarkeit in der veterinärmedizinischen Klinik.

5 Zusammenfassung

Bei der Rekonstruktion größerer Knochendefekte ist die Auswahl eines geeigneten Biomaterials entscheidend, um die mechanische Stabilität und die Vaskularisation des Knochens wiederherzustellen. Ein geeignetes Biomaterial muss sowohl biokompatibel als auch biologisch abbaubar sein und als Zellträger die Vaskularisation und Knochenbildung unterstützen.

In der eigenen Arbeit wurde eine Matrix aus Fibrin und HA-Granulen verwendet, welche zusätzlich mit HUVECs und ADSCs, als Monokultur in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro Konstrukt und als Kokultur in einer jeweiligen Konzentration von 1×10^6 Zellen pro Konstrukt, im AV-Loop-Modell implantiert wurde. Die HA-Granulen wurden aus einer 3D-gedruckten Gussform mittels Spritzgussverfahren einheitlich hergestellt. Als Fibrinmatrix wurde das kommerziell verfügbare Tisseel® (Baxter Healthcare S.A.), welches aus den Komponenten Fibrinogen 10 mg/ml und Thrombin 2 I.U. /ml besteht und bei der Applikation koagulierte, verwendet.

Die Matrix wurde in einer porösen Titankammer implantiert in welche die Gefäßschleife, bestehend aus der A., V. saphena und einem venösen Interponat, eingebettet und für sechs Wochen am medialen Oberschenkel der Ratte s.c. platziert wurde.

Für die Implantation wurden insgesamt 32 immundefiziente

RNU-Ratten verwendet, welche in die vier Materialgruppen mit jeweils acht Tieren aufgeteilt wurden. Vor der Implantation wurden die ADSCs aus humanem Fettgewebe isoliert und in einem Zellkulturmedium für zwei Wochen osteogen prädifferentiiert. Bei der Explantation erfolgte eine Perfusion mit dem Kontrastmittel Microfil® und eine anschließende histologische Auswertung der Konstrukte mithilfe der Softwareprogramme Paint3D, GIMP und ImageJ.

Die Konstrukte waren vollständig vaskularisiert. Die Matrix zeigte eine gute Biokompatibilität wenngleich die Fibrinmatrix vollständig abgebaut war, die HA-Granulen jedoch nur eine geringe Degeneration in den Randbereichen der Granulen aufwiesen. Die Fibrin- und HA-Matrix konnte ohne eine Zellimplantation zu keiner Knochenbildung führen. Jedoch führte eine Implantation der ADSCs und HUVECs zu einer Knochenbildung, wobei eine Koimplantation der ADSCs und HUVECs zu einer gesteigerten Bildung von Knochengewebe führte.

In der zweiten durchgeführten Arbeit wurden für das AV-Loop-Modell 19 Lewis-Ratten verwendet, welche in zwei Gruppen aufgeteilt wurden. Eine Matrix aus der elektrogenesponnenen Spinnenseide eADF4(C16) wurde in neun Ratten und eine Matrix aus der nassgesponnenen Spinnenseide eADF4(C16) wurde in zehn Ratten implantiert. Die Matrices wurden in einer

Teflonkammer um den AV-Loop herum am medialen Oberschenkel der Ratten s.c. für vier Wochen implantiert. Nach der Perfusion mit dem Kontrastmittel Microfil® wurde ein *ex vivo* μ CT der Konstrukte angefertigt. Die histologische Auswertung der Vaskularisation der Konstrukte konnte mittels der Softwareprogramme ImageJ und GIMP erfolgen. Die Matrix war geringgradig abgebaut und zeigte eine gute Biokompatibilität. Innerhalb der Konstrukte erfolgte eine Bildung neuen fibrovaskulären Gewebes, wenngleich sich die Vaskularisation zentral um den AV-Loop lokalisierte.

Das AV-Loop-Modell konnte in den vorliegenden Arbeiten zu einer Vaskularisation der implantierten Materialien führen. Die Fibrinmatrix zeigte eine schnellere Degeneration als die Spinnenseidenmatrizes und die HA-Granulen, mit einer Regeneration neu gebildeten Gewebes. Durch eine Implantation von HUVECs und ADSCs konnte eine Bildung vaskularisierten Knochengewebes nach sechs Wochen im AV-Loop-Modell der Ratte erzielt werden.

Die Verwendung von osteogen prädiffenzierten ADSCs und HUVECs ist im AV-Loop-Modell der Ratte eine vielversprechende Option für das Tissue Engineering. Eine längere Implantationszeit und eine Modifikation der HA-Matrix zur Steigerung der Degeneration könnte in zukünftigen Studien zu einer vermehrten Bildung des neu gebildeten

Knochengewebes führen. Auch eine Erweiterung der Methoden durch beispielsweise eine *in vivo* μ CT-Analyse, zur Darstellung der Konstruktdegeneration und -vaskularisation während der Implantationszeit oder eine histologische Einbettung ohne eine Dekalzifizierung, zur erweiterten Darstellung des mineralisierten Knochengewebes in der Histologie, könnte weitere Ergebnisse für das Tissue Engineering im AV-Loop-Modell erzielen.

6 Summary

In the reconstruction of larger bone defects the selection of a suitable biomaterial is essential to regain the mechanical stability and vascularization of the bone. A suitable biomaterial must be both biocompatible and biodegradable and, as a cell carrier, support vascularization and bone formation.

In my own work I used a matrix of fibrin and HA granules, which was additionally implanted with HUVECs and ADSCs, as monoculture in a concentration of 2×10^6 cells per construct and with a coculture in a respective concentration of 1×10^6 cells per construct, in the AV-Loop model. The HA granules were uniformly produced from a 3D-printed mold by injection molding. The fibrin was the commercially available Tisseel® (Baxter Healthcare S.A.), which coagulated from the components fibrinogen 10 mg/ml and thrombin 2 I.U. /ml during application. The matrix was placed s.c. on the medial leg of the rat in a porous titanium chamber in which the vascular loop consisting of the A., V. saphena and a venous interponate was embedded for six weeks. A total of 32 immunodeficient RNU rats were used for implantation, which were divided into the four material groups with eight animals each. Prior to implantation, ADSCs were isolated from human fat tissue and growing under osteogenic conditions in a cell culture medium for two weeks. During explantation, perfusion with the contrast

agent Microfil® was performed and subsequent histological evaluation of the construct was performed using the software programs Paint3D, GIMP and ImageJ. The constructs were fully vascularized. The matrix showed good biocompatibility, although the fibrin matrix was completely degraded and the HA granules showed little degeneration in the peripheral areas of the granules. The fibrin and HA matrix could not lead to bone formation without cellular implantation. However, implantation of the ADSCs and HUVECs resulted in bone formation, with the ADSCs and HUVECs leading to increased bone tissue formation in coimplantation.

The second study performed using 19 Lewis rats for the AV loop model which were divided into two groups. Nine rats were used for implantation of a matrix made of electro-spun spider silk eADF4(C16) and in ten rats a matrix made of wet-spun spider silk eADF4(C16) was implanted for four weeks. The matrices were implanted in a Teflon® chamber around the AV loop on the medial thigh of the rats. After perfusion with the contrast agent Microfil® an *ex vivo* μ CT of the constructs was performed. Histological evaluation of the vascularization of the constructs was performed using the software programs ImageJ and GIMP. The matrices were only slightly degraded and showed good biocompatibility. New fibrovascular tissue was formed within the constructs, although vascularization was

centralized around the AV loop. The AV loop model showed that the implanted materials were successfully vascularized. The fibrin matrix showed faster degeneration than the spider silk matrices and HA granules, with regeneration of newly formed tissue. The implantation of HUVECs and ADSCs achieved the formation of vascularized bone tissue after six weeks in the rat AV loop model.

The use of osteogenically differentiated ADSCs and HUVECs in the rat AV loop model is a promising model for the reconstruction of larger tissue defects in bone tissue engineering. A longer implantation time and a modification of the HA matrix to increase degeneration could lead to an increase in newly formed bone tissue in future studies. Further results for tissue engineering in the AV loop model could also be achieved by extending the methods to include, for example, *in vivo* μ CT analysis to visualize construct degeneration and vascularization during implantation time or histological embedding without decalcification for advanced visualization of the mineralized bone in histology.

7 Literaturverzeichnis

Alieva, M., Ritsma, L., Giedt, R. J., Weissleder, R. & van Rheenen, J. (2014) Imaging windows for long-term intravital imaging: General overview and technical insights. *Intravital*, 3(2), e29917.

Arkudas, A., Balzer, A., Buehrer, G., Arnold, I., Hoppe, A., Detsch, R., Newby, P., Fey, T., Greil, P., Horch, R. E., Boccaccini, A. R. & Kneser, U. (2013) Evaluation of angiogenesis of bioactive glass in the arteriovenous loop model. *Tissue Eng Part C Methods*, 19(6), 479-86.

Arkudas, A., Beier, J. P., Heidner, K., Tjiawi, J., Polykandriotis, E., Srouf, S., Sturzl, M., Horch, R. E. & Kneser, U. (2007a) Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng*, 13(7), 1549-60.

Arkudas, A., Beier, J. P., Prymachuk, G., Hoereth, T., Bleiziffer, O., Polykandriotis, E., Hess, A., Gulle, H., Horch, R. E. & Kneser, U. (2010) Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue Eng Part C Methods*, 16(6), 1503-14.

Arkudas, A., Prymachuk, G., Beier, J. P., Weigel, L., Korner, C., Singer, R. F., Bleiziffer, O., Polykandriotis, E., Horch, R. E. & Kneser, U. (2012) Combination of extrinsic and intrinsic

pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plast Reconstr Surg*, 129(1), 55e-65e.

Arkudas, A., Prymachuk, G., Hoereth, T., Beier, J. P., Polykandriotis, E., Bleiziffer, O., Horsch, R. E. & Kneser, U. (2009a) Dose-finding study of fibrin gel-immobilized vascular endothelial growth factor 165 and basic fibroblast growth factor in the arteriovenous loop rat model. *Tissue Eng Part A*, 15(9), 2501-11.

Arkudas, A., Tjiawi, J., Bleiziffer, O., Grabinger, L., Polykandriotis, E., Beier, J. P., Stürzl, M., Horsch, R. E. & Kneser, U. (2007b) Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model. *Mol Med*, 13(9-10), 480-7.

Arkudas, A., Tjiawi, J., Saumweber, A., Beier, J. P., Polykandriotis, E., Bleiziffer, O., Horsch, R. E. & Kneser, U. (2009b) Evaluation of blood vessel ingrowth in fibrin gel subject to type and concentration of growth factors. *J Cell Mol Med*, 13(9A), 2864-74.

Augustin, H.G. (2004) *Methods in Endothelial Cell Biology*, 1. Auflage, Springer Science & Business Media

Aumüller, G., Aust, G., Wurzinger, L. & Zilch, H. (2007) *Anatomie - Duale Reihe*, 2.Auflage, Georg Thieme Verlag KG.

Ausländer, S., Wieland, M. & Fussenegger, M. (2012) Smart medication through combination of synthetic biology and cell microencapsulation. *Metab Eng*, 14(3), 252-60.

Banwart, J. C., Asher, M. A. & Hassanein, R. S. (1995) Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine (Phila Pa 1976)*, 20(9), 1055-60.

Baron, V. T., Welsh, J., Abedinpour, P. & Borgström, P. (2011) Intravital microscopy in the mouse dorsal chamber model for the study of solid tumors. *Am J Cancer Res*, 1(5), 674-86.

Basara, G., Yue, X. & Zorlutuna, P. (2019) Dual Crosslinked Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Photolithography and 3D Printing. *Gels*, 5(3).

Biggemann, J., Hoffmann, P., Hristov, I., Simon, S., Müller, P. & Fey, T. (2020) Injection Molding of 3-3 Hydroxyapatite Composites. *Materials (Basel)*, 13(8).

Bleiziffer, O., Hammon, M., Naschberger, E., Lipnik, K., Arkudas, A., Rath, S., Prymachuk, G., Beier, J. P., Stürzl, M., Horsch, R. E. & Kneser, U. (2011) Endothelial progenitor cells are integrated in newly formed capillaries and alter adjacent fibrovascular tissue after subcutaneous implantation in a fibrin matrix. *J Cell Mol Med*, 15(11), 2452-61.

Boos, A. M., Loew, J. S., Weigand, A., Deschler, G., Klumpp, D., Arkudas, A., Bleiziffer, O., Gulle, H., Kneser, U., Horsch, R. E. & Beier, J. P. (2013) Engineering axially vascularized bone

in the sheep arteriovenous-loop model. *J Tissue Eng Regen Med*, 7(8), 654-64.

Brooks, C. G., Webb, P. J., Robins, R. A., Robinson, G., Baldwin, R. W. & Festing, M. F. (1980) Studies on the immunobiology of rnu/rnu "nude" rats with congenital aplasia of the thymus. *Eur J Immunol*, 10(1), 58-65.

Brown, E., Munn, L. L., Fukumura, D., & Jain, R. K. (2010). In vivo imaging of tumors. *Cold Spring Harbor protocols*, 2010(7).

Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M. & Stoddart, M. J. (2014) Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater*, 28, 269-86.

Buehrer, G., Balzer, A., Arnold, I., Beier, J. P., Koerner, C., Bleiziffer, O., Brandl, A., Weis, C., Horch, R. E., Kneser, U. & Arkudas, A. (2015) Combination of BMP2 and MSCs significantly increases bone formation in the rat arterio-venous loop model. *Tissue Eng Part A*, 21(1-2), 96-105.

Cahill, K. S., Chi, J. H., Day, A. & Claus, E. B. (2009) Prevalence, complications, and hospital charges associated with use of bone-morphogenetic proteins in spinal fusion procedures. *JAMA*, 302(1), 58-66.

Chen, Q. Z., Efthymiou, A., Salih, V. & Boccaccini, A. R. (2008) Bioglass-derived glass-ceramic scaffolds: study of cell

proliferation and scaffold degeneration in vitro. *J Biomed Mater Res A*, 84(4), 1049-60.

Cornejo, A., Sahar, D. E., Stephenson, S. M., Chang, S., Nguyen, S., Guda, T., Wenke, J. C., Vasquez, A., Michalek, J. E., Sharma, R., Krishnegowda, N. K. & Wang, H. T. (2012) Effect of adipose tissue-derived osteogenic and endothelial cells on bone allograft osteogenesis and vascularization in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A*, 18(15-16), 1552-61.

Cortell, S. (1969) Silicone rubber for renal tubular injection. *J Appl Physiol*, 26(1), 158-9.

Day, R. M., Boccaccini, A. R., Shurey, S., Roether, J. A., Forbes, A., Hench, L. L. & Gabe, S. M. (2004) Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, 25(27), 5857-66.

Dietz, O., Litzke, L.-F., Auer, J. A., Bonath, K. H. & Culmsee, K. (2003) *Lehrbuch der Allgemeinen Chirurgie für Tiermediziner*, 6. Auflage, Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J. & Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-7.

Ehling, J., Theek, B., Gremse, F., Baetke, S., Möckel, D., Maynard, J., Ricketts, S. A., Grüll, H., Neeman, M., Knuechel,

R., Lederle, W., Kiessling, F. & Lammers, T. (2014) Micro-CT imaging of tumor angiogenesis: quantitative measures describing micromorphology and vascularization. *Am J Pathol*, 184(2), 431-41.

El-Gendy, R., Kirkham, J., Newby, P. J., Mohanram, Y., Boccaccini, A. R. & Yang, X. B. (2015) Investigating the Vascularization of Tissue-Engineered Bone Constructs Using Dental Pulp Cells and 45S5 Bioglass® Scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 21(13-14), 2034-43.

El-Sherbiny, I. M. & Yacoub, M. H. (2013) Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2013(3), 316-42.

Erol, O. O. & Spira, M. (1979) New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Surg Forum*, 30, 530-1.

Fastermann, P. (2012) *Grundlagen und Hintergrund zum 3D-Druck*. 1. Auflage, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.

Festing, M. F., May, D., Connors, T. A., Lovell, D. & Sparrow, S. (1978) An athymic nude mutation in the rat. *Nature*, 274(5669), 365-6.

Finkenzeller, G., Graner, S., Kirkpatrick, C. J., Fuchs, S. & Stark, G. B. (2009) Impaired in vivo vasculogenic potential of endothelial progenitor cells in comparison to human umbilical

vein endothelial cells in a spheroid-based implantation model. *Cell Prolif*, 42(4), 498-505.

Folkman, J. & Hochberg, M. (1973) Self-regulation of growth in three dimensions. *J Exp Med*, 138(4), 745-53.

Fredriksson, C., Hedhammar, M., Feinstein, R., Nordling, K., Kratz, G., Johansson, J., Huss, F. & Rising, A. (2009) Tissue response to subcutaneously implanted recombinant spider silk: An In Vivo study. *Materials*, 2, 1908–1922.

Gazdag, A. R., Lane, J. M., Glaser, D. & Forster, R. A. (1995) Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg*, 3(1), 1-8.

Ghanavati, S., Yu, L. X., Lerch, J. P. & Sled, J. G. (2014) A perfusion procedure for imaging of the mouse cerebral vasculature by X-ray micro-CT. *J Neurosci Methods*, 221, 70-7.

Glass, C.K., and Natoli, G. (2016) Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol* 17, 26.

Gniesmer, S., Brehm, R., Hoffmann, A., de Cassan, D., Menzel, H., Hoheisel, A. L., Glasmacher, B., Willbold, E., Reifenrath, J., Wellmann, M., Ludwig, N., Tavassol, F., Zimmerer, R., Gellrich, N. C. & Kampmann, A. (2019) In vivo analysis of vascularization and biocompatibility of electrospun polycaprolactone fibre mats in the rat femur chamber. *J Tissue Eng Regen Med*, 13(7), 1190-1202.

Goldschlager, T., Abdelkader, A., Kerr, J., Boundy, I., & Jenkin, G. (2010). Undecalcified bone preparation for histology, histomorphometry and fluorochrome analysis. *JoVE*, (35), 1707.

Grutzendler, J., Kasthuri, N. & Gan, W.B. (2002) Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*, 420(6917), 812-6.

Guan, X., Avci-Adali, M., Alarçin, E., Cheng, H., Kashaf, S. S., Li, Y., Chawla, A., Jang, H. L. & Khademhosseini, A. (2017) Development of hydrogels for regenerative engineering. *Biotechnol J*, 12(5).

Hausman, M. R., Schaffler, M. B. & Majeska, R. J. (2001) Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone*, 29(6), 560-4.

He, P., Zhao, J., Zhang, J., Li, B., Gou, Z., Gou, M. & Li, X. (2018) Bioprinting of skin constructs for wound healing. *Burns Trauma*, 6, 5.

Hecht, S. (2008) *Röntgendiagnostik in der Kleintierpraxis*, 1. Auflage, Schattauer Verlag.

Hench, L. L. (2006) The story of Bioglass. *J Mater Sci Mater Med*, 17(11), 967-78.

Hlushchuk, R., Zubler, C., Barré, S., Correa Shokiche, C., Schaad, L., Röthlisberger, R., Wnuk, M., Daniel, C., Khoma,

O., Tschanz, S. A., Reyes, M. & Djonov, V. (2018) Cutting-edge microangio-CT: new dimensions in vascular imaging and kidney morphometry. *Am J Physiol Renal Physiol*, 314(3), F493-F499.

Holmes, R. E., Bucholz, R. W. & Mooney, V. (1987) Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *J Orthop Res*, 5(1), 114-21.

Holmes, R. E., Wardrop, R. W. & Wolford, L. M. (1988) Hydroxylapatite as a bone graft substitute in orthognathic surgery: histologic and histometric findings. *J Oral Maxillofac Surg*, 46(8), 661-71.

Horch, R. E., Beier, J. P., Kneser, U. & Arkudas, A. (2014) Successful human long-term application of in situ bone tissue engineering. *J Cell Mol Med*, 18(7), 1478-85.

Hu, Y., Feng, B., Zhang, W., Yan, C., Yao, Q., Shao, C., Yu, F., Li, F. & Fu, Y. (2019) Electrospun gelatin/PCL and collagen/PCL scaffolds for modulating responses of bone marrow endothelial progenitor cells. *Exp Ther Med*, 17(5), 3717-3726.

Huehnerschulte, T. A., Angrisani, N., Rittershaus, D., Bormann, D., Windhagen, H. & Meyer-Lindenberg, A. (2011) In Vivo Corrosion of Two Novel Magnesium Alloys ZEK100 and AX30 and Their Mechanical Suitability as Biodegradable Implants. *Materials (Basel)*, 4(6), 1144-1167.

Ismail, T., Osinga, R., Todorov, A., Haumer, A., Tchang, L. A., Epple, C., Allafi, N., Menzi, N., Largo, R. D., Kaempfen, A., Martin, I., Schaefer, D. J. & Scherberich, A. (2017) Engineered, axially-vascularized osteogenic grafts from human adipose-derived cells to treat avascular necrosis of bone in a rat model. *Acta Biomater*, 63, 236-245.

Ito, Y., Adachi, N., Nakamae, A., Yanada, S. & Ochi, M. (2008) Transplantation of tissue-engineered osteochondral plug using cultured chondrocytes and interconnected porous calcium hydroxyapatite ceramic cylindrical plugs to treat osteochondral defects in a rabbit model. *Artif Organs*, 32(1), 36-44.

Jiang, H., Cheng, P., Li, D., Li, J., Wang, J., Gao, Y., Zhang, S., Cao, T., Wang, C., Yang, L. & Pei, G. (2018) Novel standardized massive bone defect model in rats employing an internal eight-hole stainless steel plate for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 12(4), e2162-e2171.

Johansson, U., Widhe, M., Shalaly, N. D., Arregui, I. L., Nilebäck, L., Tasiopoulos, C. P., Åstrand, C., Berggren, P. O., Gasser, C. & Hedhammar, M. (2019) Assembly of functionalized silk together with cells to obtain proliferative 3D cultures integrated in a network of ECM-like microfibers. *Sci Rep*, 9(1), 6291.

Johnson, J. T., Hansen, M. S., Wu, I., Healy, L. J., Johnson, C. R., Jones, G. M., Capecchi, M. R. & Keller, C. (2006) Virtual histology of transgenic mouse embryos for high-throughput phenotyping. *PLoS Genet*, 2(4), e61.

Jukes, J. M., Both, S. K., Leusink, A., Sterk, L. M., van Blitterswijk, C. A. & de Boer, J. (2008) Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(19), 6840-5.

Keating, J. F., Simpson, A. H. & Robinson, C. M. (2005) The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br*, 87(2), 142-50.

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. & Bieback, K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294-301.

Kim, J. M., Son, J. S., Kang, S. S., Kim, G. & Choi, S. H. (2015) Bone regeneration of hydroxyapatite/alumina bilayered scaffold with 3 mm passage-like medullary canal in canine tibia model. *Biomed Res Int*, 2015, 235108.

Kirchner, T., Müller-Hermelink, H. K. & Roessner, A. (2014) *Grundmann Kurzlehrbuch Pathologie*, 12. Auflage, München: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH.

Klump, D., Rudisile, M., Kühnle, R. I., Hess, A., Bitto, F. F., Arkudas, A., Bleiziffer, O., Boos, A. M., Kneser, U., Horch, R. E. & Beier, J. P. (2012) Three-dimensional vascularization of electrospun PCL/collagen-blend nanofibrous scaffolds in vivo. *J Biomed Mater Res A*, 100(9), 2302-11.

Koob, S., Torio-Padron, N., Stark, G. B., Hannig, C., Stankovic, Z. & Finkenzeller, G. (2011) Bone formation and neovascularization mediated by mesenchymal stem cells and endothelial cells in critical-sized calvarial defects. *Tissue Eng Part A*, 17(3-4), 311-21.

Krucker, T., Lang, A. & Meyer, E. P. (2006) New polyurethane-based material for vascular corrosion casting with improved physical and imaging characteristics. *Microsc Res Tech*, 69(2), 138-47.

Kumar, H. & Kim, K. (2020) Stereolithography 3D Bioprinting. *Methods Mol Biol*, 2140, 93-108.

König & Liebich (2014) *Anatomie der Haussäugetiere*, 6. Auflage, Schattauer Verlag.

Lang, G. (2012) *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*, 2. Auflage, Springer-Verlag

Lampert, F. M., Simunovic, F., Finkenzeller, G., Pfeifer, D., Stark, G. B., Winninger, O. & Steiner, D. (2016) Transcriptomic Changes in Osteoblasts Following Endothelial Cell-Cocultivation Suggest a Role of Extracellular Matrix in Cellular Interaction. *J Cell Biochem*, 117(8), 1869-79.

Lee, E. J., Kasper, F. K. & Mikos, A. G. (2014) Biomaterials for tissue engineering. *Ann Biomed Eng*, 42(2), 323-37.

Lehr, H.A., Leunig, M., Menger, M.D., Nolte, D., Messmer, K. (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol.*143(4), 1055-62.

Lin, C.S., Xin, Z.C., Deng, C.H., Ning, H., Lin, G., Lue, T.F. (2010) Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*, 25(6), 807-15.

Liu, Q., Douglas, T., Zamponi, C., Becker, S. T., Sherry, E., Sivananthan, S., Warnke, F., Wiltfang, J. & Warnke, P. H. (2011) Comparison of in vitro biocompatibility of NanoBone(®) and BioOss(®) for human osteoblasts. *Clin Oral Implants Res*, 22(11), 1259-64.

Liu, X., Chen, W., Zhang, C., Thein-Han, W., Hu, K., Reynolds, M. A., Bao, C., Wang, P., Zhao, L. & Xu, H. H. K. (2017a) Co-Seeding Human Endothelial Cells with Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells on Calcium Phosphate Scaffold Enhances Osteogenesis and Vascularization in Rats. *Tissue Eng Part A*, 23(11-12), 546-555.

Liu, H., Zhu, R., Liu, C., Ma, R., Wang, L., Chen, B., Li, L., Niu, J., Zhao, D., Mo, F., Fu, M., Brömme, D., Zhang, D., & Gao, S. (2017b). Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. *BioMed research international*, 2017, 9050754.

Lovett, M., Eng, G., Kluge, J. A., Cannizzaro, C., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L. (2010). Tubular silk scaffolds

for small diameter vascular grafts. *Organogenesis*, 6(4), 217–224.

Luginina, M., Schuhladen, K., Orrú, R., Cao, G., Boccaccini, A. R. & Liverani, L. (2020) Electrospun PCL/PGS Composite Fibers Incorporating Bioactive Glass Particles for Soft Tissue Engineering Applications. *Nanomaterials (Basel)*, 10(5), 978

McGavin, M. D. & Zachary, J. F. (2009) *Pathologie der Haussäugetiere: Allgemeine, spezielle und funktionelle Veterinärpathologie*, 1. Auflage, München: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH.

Modlinska, K., & Pisula, W. (2020). The Norway rat, from an obnoxious pest to a laboratory pet. *eLife*, 9, e50651.

Mutschall, H., Winkler, S., Weisbach, V., Arkudas, A., Horch, R. E. & Steiner, D. (2020) Bone tissue engineering using adipose-derived stem cells and endothelial cells: Effects of the cell ratio. *J Cell Mol Med*, 24(12), 7034-7043

Negro, A., Cherbuin, T. & Lutolf, M. P. (2018) 3D Inkjet Printing of Complex, Cell-Laden Hydrogel Structures. *Sci Rep*, 8(1), 17099.

Noli, C., Scarampella, F. & Toma, S. (2014) *Praktische Dermatologie bei Hund und Katze: Klinik - Diagnose - Therapie*. Verlag Schlütersche, 3. Auflage

Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A. & Webster, T. J. (2017) A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine*, 12, 4937-4961.

Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., Jorgensen, C. & Cousin, B. (2008) Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res*, 314(7), 1575-84.

Pelzer, M., Larsen, M., Chung, Y. G., Ohno, T., Platt, J. L., Friedrich, P. F. & Bishop, A. T. (2007) Short-term immunosuppression and surgical neoangiogenesis with host vessels maintains long-term viability of vascularized bone allografts. *J Orthop Res*, 25(3), 370-7.

Polykandriotis, E., Arkudas, A., Beier, J. P., Hess, A., Greil, P., Papadopoulos, T., Kopp, J., Bach, A. D., Horch, R. E. & Kneser, U. (2007) Intrinsic axial vascularization of an osteoconductive bone matrix by means of an arteriovenous vascular bundle. *Plast Reconstr Surg*, 120(4), 855-68.

Polykandriotis, E., Drakotos, D., Arkudas, A., Pryymachuk, G., Rath, S., Beier, J. P., Klumpp, D., Dragu, A., Horch, R. E. & Kneser, U. (2011) Factors influencing successful outcome in the arteriovenous loop model: a retrospective study of 612 loop operations. *J Reconstr Microsurg*, 27(1), 11-8.

Polykandriotis, E., Tjiawi, J., Euler, S., Arkudas, A., Hess, A., Brune, K., Greil, P., Lametschwandtner, A., Horch, R. E. &

Kneser, U. (2008) The venous graft as an effector of early angiogenesis in a fibrin matrix. *Microvasc Res*, 75(1), 25-33.

Punke, C., Zehlicke, T., Just, T., Holzhüter, G., Gerber, T. & Pau, H. W. (2012) Matrix change of bone grafting substitute after implantation into guinea pig bulla. *Folia Morphol (Warsz)*, 71(2), 109-14.

Rath, S. N., Arkudas, A., Lam, C. X., Olkowski, R., Polykandriotis, E., Chróscicka, A., Beier, J. P., Horch, R. E., Hutmacher, D. W. & Kneser, U. (2012) Development of a pre-vascularized 3D scaffold-hydrogel composite graft using an arterio-venous loop for tissue engineering applications. *J Biomater Appl*, 27(3), 277-89.

Romano, R., Palamaro, L., Fusco, A., Giardino, G., Gallo, V., Del Vecchio, L., & Pignata, C. (2013). FOXN1: A Master Regulator Gene of Thymic Epithelial Development Program. *Frontiers in immunology*, 4, 187.

Rottensteiner, U., Sarker, B., Heusinger, D., Dafinova, D., Rath, S. N., Beier, J. P., Kneser, U., Horch, R. E., Detsch, R., Boccaccini, A. R. & Arkudas, A. (2014) In vitro and in vivo Biocompatibility of Alginate Dialdehyde/Gelatin Hydrogels with and without Nanoscaled Bioactive Glass for Bone Tissue Engineering Applications. *Materials (Basel)*, 7(3), 1957-1974.

Rouwkema, J., de Boer, J. & Van Blitterswijk, C. A. (2006) Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular

network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng*, 12(9), 2685-93.

Sahni, A. & Francis, C. W. (2000) Vascular endothelial growth factor binds to fibrinogen and fibrin and stimulates endothelial cell proliferation. *Blood*, 96(12), 3772-8.

Salehi, S., Koeck, K. & Scheibel, T. (2020) Spider Silk for Tissue Engineering Applications. *Molecules*, 25(3).

Sarker, B., Papageorgiou, D. G., Silva, R., Zehnder, T., Gul, E. N. F., Bertmer, M., Kaschta, J., Chrissafis, K., Detsch, R. & Boccaccini, A. R. (2014) Fabrication of alginate-gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. *J Mater Chem B*, 2(11), 1470-1482.

Schaad, L., Hlushchuk, R., Barré, S., Gianni-Barrera, R., Haberthür, D., Banfi, A. & Djonov, V. (2017) Correlative Imaging of the Murine Hind Limb Vasculature and Muscle Tissue by MicroCT and Light Microscopy. *Sci Rep*, 7, 41842.

Schacht, V., Berens von Rautenfeld, D. & Abels, C. (2004) The lymphatic system in the dorsal skinfold chamber of the Syrian golden hamster in vivo. *Arch Dermatol Res*, 295, 542–548 .

Schacht, K.; Vogt, J.; Scheibel, T. (2016) Foams made of engineered recombinant spider silk proteins as 3D scaffolds for cell growth. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2, 517–525

Schechner, J. S., Nath, A. K., Zheng, L., Kluger, M. S., Hughes, C. C., Sierra-Honigmann, M. R., Lorber, M. I., Tellides, G., Kashgarian, M., Bothwell, A. L. & Pober, J. S. (2000) In vivo formation of complex microvessels lined by human endothelial cells in an immunodeficient mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(16), 9191-6.

Schemitsch, E. H. (2017) Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma*, 31(5), 20-22.

Schmidt, R. F., Lang, F. & Heckmann, M. (2011) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 31. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag.

Schmidt, V. J., Covi, J. M., Koepple, C., Hilgert, J. G., Polykandriotis, E., Bigdeli, A. K., Distel, L. V., Horch, R. E. & Kneser, U. (2017) Flow Induced Microvascular Network Formation of Therapeutic Relevant Arteriovenous (AV) Loop-Based Constructs in Response to Ionizing Radiation. *Med Sci Monit*, 23, 834-842.

Schmidt, V. J., Hilgert, J. G., Covi, J. M., Weis, C., Wietbrock, J. O., de Wit, C., Horch, R. E. & Kneser, U. (2013) High flow conditions increase connexin43 expression in a rat arteriovenous and angiointuctive loop model. *PLoS One*, 8(11), e78782.

Schürmann, C., Gremse, F., Jo, H., Kiessling, F. & Brandes, R. P. (2015) Micro-CT Technique Is Well Suited for Documentation of Remodeling Processes in Murine Carotid Arteries. *PLoS One*, 10(6), e0130374.

Seifi, M., Arayesh, A., Shamloo, N. & Hamed, R. (2015) Effect of nanocrystalline hydroxyapatite socket preservation on orthodontically induced inflammatory root resorption. *Cell J*, 16(4), 514-27.

Shields, L. B., Raque, G. H., Glassman, S. D., Campbell, M., Vitaz, T., Harpring, J. & Shields, C. B. (2006) Adverse effects associated with high-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 use in anterior cervical spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31(5), 542-7.

Sinowatz, F. & Rodler, D. (2019) *Histologie in der Tiermedizin: Grundlagen, Techniken, Präparate*. 1. Auflage, Hannover: Schlütersche Verlagsgesellschaft.

Son, S. R., Linh, N. B., Yang, H. M. & Lee, B. T. (2013) and. *Sci Technol Adv Mater*, 14(1), 015009.

Sousa, I., Mendes, A. & Bártolo, P. J. (2013) PCL Scaffolds with Collagen Bioactivator for Applications in Tissue Engineering. *Procedia Engineering*, 59, 279-284.

Souza-Offtermatt, G., Staubach, K.-H., Sterk, P., Udolph, A. (2004) *Intensivkurs Chirurgie*. 1. Auflage, München: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH.

Speckmann, E. J., Hescheler, J. & Köhling, R. (2019) *Physiologie: Das Lehrbuch*, 7. Auflage, Elsevier Health Service.

Steiner, D., Lingens, L., Fischer, L., Kohn, K., Detsch, R., Boccaccini, A. R., Fey, T., Greil, P., Weis, C., Beier, J. P., Horch, R. E. & Arkudas, A. (2018) Encapsulation of Mesenchymal Stem Cells Improves Vascularization of Alginate-Based Scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 24(17-18), 1320-1331.

Streckbein, P., Jäckel, S., Malik, C.Y., Obert, M., Kähling, C., Wilbrand, J.F., Zahner, D., Heidinger, K., Kampschulte, M., Pons-Kühnemann, J., Köhler, K., Sauer, H., Kramer, M. & Howaldt, H.P. (2013) Reconstruction of critical-size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. *J Craniomaxillofac Surg*. 41(6), 496-503.

Takemoto, M., Fujibayashi, S., Neo, M., Suzuki, J., Kokubo, T. & Nakamura, T. (2005) Mechanical properties and osteoconductivity of porous bioactive titanium. *Biomaterials*, 26(30), 6014-23.

Tanaka, Y., Sung, K. C., Tsutsumi, A., Ohba, S., Ueda, K. & Morrison, W. A. (2003) Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plast Reconstr Surg*, 112(6), 1636-44.

Tannoury, C. A. & An, H. S. (2014) Complications with the use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery. *Spine J*, 14(3), 552-9.

Tavassol, F., Kampmann, A., Schumann, P., Lindhorst, D., Kokemüller, H., Essig, H., Meemken, J. H., Rücker, M. & Gellrich, N. C. (2011) A novel approach for studying microcirculation in bone defects by intravital fluorescence microscopy. *Tissue Eng Part C Methods*, 17(12), 1151-9.

van Hinsbergh, V. W., Collen, A. & Koolwijk, P. (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 936, 426-37.

Villars, F., Guillotin, B., Amedee, T., Dutoya, S., Bordenave, L., Bareille, R. & Amedee, J. (2002a) Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(4), C775-85.

Vogel, A. (2015) *Chirurgie - in Frage und Antwort*, 8. Auflage, München: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH.

Wang, J., Ye, Y., Tian, H., Yang, S., Jin, X., Tong, W. & Zhang, Y. (2011) In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 412(1), 143-9.

Wang, Y. H., Liu, Y., Maye, P. & Rowe, D. W. (2006) Examination of mineralized nodule formation in living osteoblastic cultures using fluorescent dyes. *Biotechnology progress*, 22(6), 1697-1701.

Weigand, A., Beier, J. P., Arkudas, A., Al-Abboodi, M., Polykandriotis, E., Horch, R. E. & Boos, A. M. (2016a) The Arteriovenous (AV) Loop in a Small Animal Model to Study Angiogenesis and Vascularized Tissue Engineering. *JoVE* (117).

Weigand, A., Beier, J. P., Hess, A., Gerber, T., Arkudas, A., Horch, R. E. & Boos, A. M. (2015) Acceleration of vascularized bone tissue-engineered constructs in a large animal model combining intrinsic and extrinsic vascularization. *Tissue Eng Part A*, 21(9-10), 1680-94.

Weigand, A., Boos, A. M., Tasbihi, K., Beier, J. P., Dalton, P. D., Schrauder, M., Horch, R. E., Beckmann, M. W., Strissel, P. L. & Strick, R. (2016b) Selective isolation and characterization of primary cells from normal breast and tumors reveal plasticity of adipose derived stem cells. *Breast Cancer Res*, 18(1), 32.

Weis, C., Covi, J. M., Hilgert, J. G., Leibig, N., Arkudas, A., Horch, R. E., Kneser, U. & Schmidt, V. J. (2015) Automatic quantification of angiogenesis in 2D sections: a precise and timesaving approach. *J Microsc*, 259(3), 185-96.

Weyrauch, K.D., Smollich, A. & Plendl, J. (2009) *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag.

Widhe, M., Johansson, U., Hillerdahl, C. O., Hedhammar, M. (2013) Recombinant spider silk with cell binding motifs for specific adherence of cells. *Biomaterials*. 34:8223–8234.

Willems, W. F., Kremer, T., Friedrich, P. & Bishop, A. T. (2014) Surgical revascularization in structural orthotopic bone allograft increases bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*, 472(9), 2870-7.

Wilson, J. L., Najia, M. A., Saeed, R. & McDevitt, T. C. (2014) Alginate encapsulation parameters influence the differentiation of microencapsulated embryonic stem cell aggregates. *Biotechnol Bioeng*, 111(3), 618-31.

Wohlrab, S., Müller, S., Schmidt, A., Neubauer, S., Kessler, H., Leal-Egaña, A. & Scheibel, T. (2012) Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials*, 33(28), 6650-9.

Wolberg, A.S. (2007) Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev*, 21(3), 131-42.

Xia, Y., Zhou, P., Cheng, X., Xie, Y., Liang, C., Li, C. & Xu, S. (2013) Selective laser sintering fabrication of nano-hydroxyapatite/poly- ϵ -caprolactone scaffolds for bone tissue engineering applications. *Int J Nanomedicine*, 8, 4197-213.

Yamamoto, N., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Yamada, T., Nakata, S., Ohkuma, M., Miyachi, E., Marunouchi, T., Matsunaga, K. (2007) Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci*, 48(1), 43-52.

Yu, X., Tang, X., Gohil, S. V. & Laurencin, C. T. (2015) Biomaterials for Bone Regenerative Engineering. *Adv Healthc Mater*, 4(9), 1268-85.

Yuan, H., Fernandes, H., Habibovic, P., de Boer, J., Barradas, A. M., de Ruiter, A., Walsh, W. R., van Blitterswijk, C. A. & de Bruijn, J. D. (2010) Osteoinductive ceramics as a synthetic

alternative to autologous bone grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(31), 13614-9.

Zeplin, P.H., Maksimovikj, N.C., Jordan, M.C., Nickel, J., Lang, G., Leimer, A.H., Römer, L. and Scheibel, T. (2014), Spider Silk Coatings as a Bioshield to Reduce Periprosthetic Fibrous Capsule Formation. *Adv. Funct. Mater*, 24: 2658-2666

Zhao, X., Lang, Q., Yildirimer, L., Lin, Z. Y., Cui, W., Annabi, N., Ng, K. W., Dokmeci, M. R., Ghaemmaghami, A. M. & Khademhosseini, A. (2016) Photocrosslinkable Gelatin Hydrogel for Epidermal Tissue Engineering. *Adv Healthc Mater*, 5(1), 108-18.

Zheng, J. S., Ruan, H. R., Shuang-Qiu, Jing-Nie, Hou, K. W. & Rui-Wu (2020) Therapeutic Effects of Revascularisation on the Healing of Free Bone Grafts in Dogs. *J Vet Res*, 64(1), 175-180.

Zheng, P., Yao, Q., Mao, F., Liu, N., Xu, Y., Wei, B. & Wang, L. (2017) Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in 3D printed poly-epsilon-caprolactone/hydroxyapatite scaffolds combined with bone marrow clots. *Mol Med Rep*, 16(4), 5078-5084.

Zhu, W., Ma, X., Gou, M., Mei, D., Zhang, K. & Chen, S. (2016) 3D printing of functional biomaterials for tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*, 40, 103-112.

8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. A. Meyer- Lindenberg bedanken, die sich trotz der Entfernung der Betreuung meines Promotionsvorhabens angenommen hat und mir ermöglichte die Promotion an der Ludwig-Maximilians-Universität in München zu absolvieren.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. E. Horch und Herrn Prof. Dr. med. A. Arkudas für die Möglichkeit bedanken die letzten Jahre an vielfältigen Forschungsprojekten teilnehmen zu können.

Als wissenschaftliche Mitarbeiterin wurde ich in der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen umfassend betreut. Besonders möchte ich auch Herrn Dr. med. D. Steiner danken, der für alles eine Lösung hatte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und Hilkea Mutschall, ohne die die langen Laborabende nur halb so viel Spaß gemacht hätten. Auch allen mitwirkenden Autoren danke ich für diese erfolgreiche Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden dafür danken, dass sie mich immer unterstützt haben.